



# BEST AVAILABLE COPY

Patent

Customer No. 22,852

Attorney Docket No. 04853.0086

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: )  
OGATA et al. ) Group Art Unit: 1646  
Application No.: 10/019,571 ) Examiner: Ruixiang Li  
§ 371 Date: December 31, 2001 )  
PCT Filing Date: July 3, 2000 )  
For: THERAPEUTIC AGENT FOR )  
DISEASES CAUSED BY PTH OR )  
PTHrP )

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

### Declaration Pursuant to In Re Hawkins, 179 U.S.P.Q. 157 (C.C.P.A. 1973)

I, Rebecca M. McNeill, do hereby declare and say that:

1. The specification at page 7, second paragraph is amended to recite that "[i]n the present specification, the term 'a PTH receptor or PTHrP receptor' is used to mean a receptor binding to PTH or PTHrP, and examples include a PTH/PTHrP type I receptor (described in Japanese Patent Application Laying-Open (kohyo) No. 6-506598; ~~SEQ ID NO: 76~~)." The amendatory material is shown with underlining.

2. This amendatory material (SEQ ID NO. 76) is quoted from the reference cited in the same paragraph. See Japanese Patent Application Laying-Open (kohyo) No. 6-506598, Figure 6; See also WO 92/17602, the English-language equivalent, Figure 6 and description of the drawings at page 8, third paragraph. This Japanese patent application is incorporated by reference on page 84, lines 5-6 of the specification.

PATENT  
Customer No. 22,852  
Attorney Docket No. 04853.0086  
Application No. 10/019,571

3. Thus, no new matter is introduced by way of this amendment.
4. I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true; that all statements made on information and belief are believed to be true; that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code; and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Dated: November 18, 2004

By: Rebecca M. McNeill  
Rebecca M. McNeill  
Reg. No. 43,796

## BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-506598

(43)公表日 平成6年(1994)7月28日

第1部門第1区分

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 N 15/12	ZNA		
A 61 K 37/02	ADD	8314-4C	
	AEG		
		9050-4B	C 12 N 15/00
		8412-4B	5/00
			A
			B
			審査請求 未請求 予満審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平4-510035  
 (86) (22)出願日 平成4年(1992)4月6日  
 (85)翻訳文提出日 平成5年(1993)10月5日  
 (86)国際出願番号 PCT/US92/02821  
 (87)国際公開番号 WO92/17693  
 (87)国際公開日 平成4年(1992)10月15日  
 (31)優先権主張番号 681,702  
 (32)優先日 1991年4月5日  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL,  
 SE), CA, JP

(71)出願人 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フルーツストリート 55  
 (72)発明者 セグレ ギノ ブイ  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウエイランド セジメドウロード58  
 (72)発明者 クロネンベルグ ヘンリー エム  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベルモント ハイスティングスロード 46  
 (74)代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 副甲状腺ホルモンのレセプターとそれをコードしているDNA

(57)【要約】

副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDN  
 A、組換え及び合成副甲状腺ホルモンレセプター-ボリペ  
 プチド及びその断片、副甲状腺ホルモンレセプター及び  
 レセプター断片に対する抗体、候補化合物を副甲状腺ホ  
 ルモンレセプターの作用に対するアンタゴニストあるいは  
 アゴニスト効果についてスクリーニングする方法、及び  
 これらの化合物の利用による診断と治療法が開示され  
 る。

## 特許平6-506598 (2)

## 請求の範囲

1. 前記動物の細胞レセプターをコードしているDNA配列からなる分離されたDNAであって、前記レセプターが、図3に示されているアミノ酸配列に少なくとも30%の同一性を持つアミノ酸配列を持つことを特徴とする方法。

2. 前文項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNA配列が図1に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 1) の本質的すべてをコードしていることを特徴とする方法。

3. 前文項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図3に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 3) の本質的すべてをコードしていることを特徴とする方法。

4. 前文項1に記載されている分離されたDNAであって、前記分離されたDNAが (々々々) であって、ATCCに登録され、ATCC登録番号570と呼ばれていることを特徴とする方法。

5. 前文項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図3に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 4) の本質的すべてをコードしていることを特徴とする方法。

6. 前文項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図1に示されているDNA配列 SEQ ID NO. 1 とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

7. 前文項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図3に示されているDNA配列 (SEQ ID NO. 3) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

16. 前文項1～15に記載されている1本鎖DNAであって、前記部分が前記甲状腺ホルモンレセプター遺伝子のすべてより短いことを特徴とする方法。

17. 前文項1～16に記載されている1本鎖DNAであって、上記DNAが後述されて検出可能であることを特徴とする方法。

18. 制甲状腺ホルモンレセプターcDNAの1部からなる1本鎖DNAであって、上記部分が少なくともB3'クレオチドの長さであることを特徴とする方法。

19. 前文項1～18に記載されている1本鎖DNAであって、前記DNAがアンチセンスであることを特徴とする方法。

20. 制甲状腺ホルモンレセプターをコードしている純度のDNA分子の量によって生成される制甲状腺ホルモンレセプターを特徴とする方法。

21. 前文項20に記載されている制甲状腺ホルモンレセプターの本質的に特徴された構造を特徴とする方法。

22. 前文項1～21に記載されているDNAの発現によって、生成される制甲状腺レセプターの本質的に精製された構造を特徴とする方法。

23. 少なくとも約30%、そして制甲状腺ホルモンレセプターの完全なアミノ酸配列よりも少ないアミノ酸からなるポリペプチドであって、上記ポリペプチドが制甲状腺ホルモンあるいは制甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合することを特徴とする方法。

24. 前文項23に記載されているポリペプチドであって、上記制甲状腺ホルモンレセプターがヒト制甲状腺レセプターであることを特徴とする方法。

8. 前文項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図6に示されているDNA配列 (SEQ ID NO. 4) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

9. ベクターの精製標品であって、前記ベクターが制甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列からなることを特徴とする方法。

10. 搽水液中に記載されている分離されたDNAを含む細胞であることを特徴とする方法。

11. 前文項10に記載されている細胞であって、前記細胞が前記の分離されたDNAから上記制甲状腺レセプターを発現する能力のあることを特徴とする方法。

12. 水質的に均質な精製液であって、その呑みが前文項1に記載されている分離されたDNAを含むことを特徴とする方法。

13. 分離されたDNAが、前記甲状腺ホルモンあるいは制甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合することの出来るポリペプチドをコードしているDNA配列からなることを特徴とする方法。

14. ポリペプチドを含む方波で、前記方法が以下のことからなることを特徴とする：

前記甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を培養する方法、及び

前記DNAからポリペプチドの発現を可能にする条件下前記蛋白質を培養する方法。

15. 制甲状腺ホルモンレセプター遺伝子の1部からなる1本鎖DNAであって、前記部分が少なくとも100bpの長さであることを特徴とする方法。

16. 前文項2～15に記載されているポリペプチドであって、上記断片が以下のものからなることを特徴とする方法。

(a) TMETREREVFDRLGMIVTYG,

(b) YLYSGFTLDEAERLTSEEL,

(c) VTFELFLATNYWILVSG,

(d) Y-DATLANTCWDLSSCHKKWIIQWP,

(e) PYTEVSQTLWQIQMHYEM,

(f) DDVFTKKEQIELLERAQA,

(g) FPRLLHCTRNY,

(h) EKKEYLWQPTL,

(i) VLATKKERETNAACRCGTRDQYRKLLK、あるいは

(j) 制甲状腺ホルモンあるいは制甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来る(i)から(i)の断片。

26. 製剤上除去される固体中に、(a) 制甲状腺ホルモンレセプターあるいは(b) 上記シザーゼの断片からなるポリペプチドを含む前記混合物を特徴とする方法。

27. 制甲状腺ホルモンレセプターと免疫蛋白体を形成することが出来る試体を特徴とする方法。

28. 前文項27に記載されている抗体と製剤上除去される固体からなる治療薬合物を行取する方法。

29. 動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、前文項26に記載されている治療蛋白質を、上記動物に、制甲状腺ホルモンあるいは制甲状腺ホルモン関連蛋白質による、上記動物の制甲状腺ホルモンレセプターの活性化の程度に効用的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。

## 特許平6-506598 (9)

3.0. 動物の血中カルシウムレベルを経減する方法であって、請求項2.8に記載されている抗酸化化合物を、上記動物に、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による、上記動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化の程度に効率的に用意で投与することからなることを特徴とする方法。

3.1. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を組成する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

(a) 請求項2.3に記載されているボリペプチドを副甲状腺ホルモンと、候補化合物の(1)存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記ボリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル(1)を、上記候補化合物の存在下における上記ボリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル(11)と比較する； 上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物は上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

3.2. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のある化合物を組成する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

(a) 請求項2.3に記載されているボリペプチドを副甲状腺ホルモン関連蛋白質と、候補化合物の(1)存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記ボリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白への結合レベル(1)を、上記候補化合物の存在下における上記ボリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル(11)と比較する； 上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物は上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

3.7. 副甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしているDNA配列からなるトランスクレベント型転写されたヒト以外の脊椎動物を特徴とする方法。

## 3.8. 以下的内容からなる診断法を特徴とする方法：

(a) 動物から1回目の血液試料を取り；

(b) 請求項3.9に記載されている抗体を上記動物に投与し；

(c) 上記混合後の上記試料とのあとに上記動物から2回目の血液試料を取り；

(d) 上記1回目の血液試料中のカルシウムレベルを上記2回目の血液試料中のものと比較し、上記2回目の血液試料中のカルシウムレベルの方が低い場合は、副甲状腺ホルモン関連の状態を診断に立てる。

3.9. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、上記DNAの配列が副甲状腺ホルモンレセプターをコードしていることを特徴とする方法。

4.0. 請求項2.6に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

4.1. 請求項2.3に記載されているボリペプチドを内腔及び皮膚に用いることを特徴とする方法。

4.2. 請求項2.7に記載されている抗体を治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

4.3. 請求項2.6に記載されている抗酸化化合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

3.3. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を組成する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

(a) 副甲状腺ホルモンを海水槽(3)に記載されている初期と、候補化合物の(1)が存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプターの結合レベル(1)を、上記候補化合物の非存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプターの結合レベル(11)と比較する； 上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物は上記レセプターへの結合に対し上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

3.4. 副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質の細胞表面上の副甲状腺レセプターへの結合を阻害する能力のある化合物を特徴とする方法。

3.5. 請求項3.4に記載されている化合物と製剤上計算される濃度からなる治療化合物を特徴とする方法。

3.6. 副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列に相同的なDNA配列を組成する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

ゲノムあるいはcDNAライブラーを還元し；

上記ライブラーを海水槽(1)に記載されている1本級DNAと、上記1本級DNA及び上記ライブラー中の相同DNA配列間にハイブリッド形成が可能なような条件下に接触させ； 及び

上記ライブラーから、上記1本級DNAとハイブリッドを形成しているクローンを割り出し確認する。そして、ハイブリッド形成は、上記クローンの中に、副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列に相同的なDNA配列の存在することを示唆する。

4.4. 請求項2.8に記載されている治療混合物、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

4.5. 請求項2.0に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

4.6. 請求項2.3に記載されているボリペプチドを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

4.7. 請求項2.7に記載されている抗体を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

4.8. 患者における副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質によって示唆される高カルシウム血症状態を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする方法：

(a) 患者からの1回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、

(b) 請求項2.8に記載されている治療混合物の投与前のものと同時に患者から採取された2回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、

(c) 2つの血液試料のカルシウムレベルを比較して、2回目の血液試料中のカルシウムレベルの方がより高い場合は、患者に副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質に關係のある疾患のあることを示唆する。

## 特表平6-506598 (4)

発明　本邦　一般  
副甲状腺ホルモンのレセプターとそれをコードしているDNA

## 発明の背景

(1) ここに記載する研究の助成金は一部アメリカ合衆国政府によって提供されたものであり、同政府は本発明に対し一定の権利を保有する。

本発明は内分泌系セプターに関する。

ホルモン作用質膜の質膜な変形は、ホルモンと類似細胞の膜型質膜受容体上にあるレセプターとの相互作用である。ホルモンレセプター複合体の形成によって、細胞内シグナルを細胞内に導入して種々の生物学的反応を誘導することが可能となる。例えば、胎児胎盤ホルモン（PTG）、腎皮质ホルモン（SH）、甲状腺ホルモン（T<sub>3</sub>T<sub>4</sub>）及び胎毛性腺刺激ホルモン（CC）のようなホルモンの、その細胞表面レセプターへの結合はレセプターの高次構造の変化を誘導し、その結果、レセプターと輸入分子、即ち、その一部分が（G<sub>s</sub>）である活性化アミノ酸キレオチド（GTP）結合蛋白質との連携が起こる。この連携はアデニル酸シクラーゼを刺激し、次いで蛋白質のリン酸化、ステロイドの合成と分泌、及びイオンチャネルの開閉のような他の細胞の過程を制御する。アルギニンペプチダーゼ（AV）、アンジオテンシンI、及びノルエピネフリンを含む他のホルモンの、その細胞表面レセプターへの結合の結果、（G<sub>p</sub>）のような別のタイプのGTP結合蛋白質成分の活性化をもたらし、次いで酵素ホスカリバーゼCの活性を制御する。ホスホリバーゼCによりも加水分解の生成物は、細胞内カルシウムの動員と蛋白質のサン活性化をもむ細胞内現象の調節をカスケードを引き起こす。

副甲状腺ホルモン（PTG）はカルシウムの正常運営の主要な調節物質であり、その重要な機能的細胞内行動や質膜に存在する。カルシウム濃度の調節は、骨筋、筋肉、神経、呼吸器、及び心臓血管などの系の正常な機能のために必要である。PTGの合成と分泌は、主として血漿のカルシウムレベルによって制御される：低レベルはホルモンの合成と分泌の両方を制限し、高レベルは抑制する。次いでPTGは、包括的なには選択的に、3つのカルシウム交換部位、即ち、筋、骨、及

び脳におけるカルシウムの血中への注入を促進することによって血漿カルシウムレベルを維持する。PTGは脳膜における細胞表面ビタミンDの活性化を説明することによってカルシウムの脳膜からの吸収に寄与する。PTGは細胞細胞を促進し、また、臨時に、骨吸收細胞である破骨細胞の分化を促進することによって骨からのカルシウム再吸収を促進する。このホルモンは、また、腎臓に勾する少なくとも3つの効果：尿細管のカルシウム再吸収の刺激、リン酸クリアランスの向上、及び活性型ビタミンDの合成を完結する胎盤豊富な細胞で介する。PTGによるレセプター仲介のキスホリバーゼCの活性化も報告されている（Mitsushige et al., J. Clin. Invest. 79: 230, 1987）。PTGはこれらの効果を主としてレセプター仲介によるアデニル酸シクラーゼの活性化を通じて発現する。

カルシウム活性化的初期は多くの臨床的障害（例えば、頭痛などの疼痛、貧血、食欲不振、夜尿、筋肉痙攣、及び神経障害）を引き起こすことがあり、骨筋は、細胞表面ホルモンのレベルの変化を起こすような状態に影響するものである。高カルシウム血症は血漿カルシウムレベルの上昇を示すとする症状である。それは、しばしば、副甲状腺の腫瘍（例えば、結節、嚢胞、または結節）の結果としてPTGの生産過剰が起こる一次性副甲状腺機能亢進症に関連している。もう一つのタイプの高カルシウム血症、悪性の腫瘍性高カルシウム血症（骨肉瘤）はもっとも普通の原因である。それは最近の発見、筋肉（筋肉、骨筋、筋膜または筋膜の細胞）によるPTGとアミノ酸相関性を共有する新しいクラスの蛋白質ホルモンの合成に起因するようである。これらのPTG並列蛋白質（PTG-P）は一見、PTGの質膜と細胞に対する作用のあるものを模倣し、これらの組織におけるPTGレセプターと相補作用すると信じられている。PTG-Pは、筋肉、ケラチノサイト、筋、下垂体、副甲状腺、副腎皮質、腎臓、肺泡の細胞、唾液腺細胞、及び歯乳頭の乳汁を含む多くの組織に少量見出される。多くの日常生活現象において、PTG-Pは脂溶性に高レベルで見出され、日光熱闘争の潜伏カルシウムレベルを示す。

## ・発明の範囲

(5) 本発明は脊椎動物の細胞のレセプター、望むべくは、副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列からなる分離されたDNAを特徴とする。このレセプターは、固有に示されているアミノ酸配列（SEQ ID NO.: 3）に対し少なくとも30%（望ましいのは少なくとも50%、又は望ましいのは少なくとも60%、そして最も望ましいのは少なくとも75%）同一のアミノ酸配列を持ったものである；即ち、2つのアミノ酸配列間で（標準の方法を用いて）既遺伝子位を求める場合、前者の配列のアミノ酸残基の少なくとも30%が後者の配列のアミノ酸残基と同一ということである。「分離された」とは、このDNAが、本発明のDNAが含むする（何であれ）生体に本物あるゲノム内で、本発明のDNAをコードしている染色体上に直接隣接している遺伝子のコーディング配列を全く内れないという意味である。分離されたDNAは1本鎖、または2本鎖でもよく、また、ゲノムDNA、cDNA、別種ハイブリッドDNA、あるいは合成DNAなどよい。それは自然に存在する細胞のレセプター（例えば、PTGレセプター）をコードしているかDNA配列と同一かも知れず、あるいは、このかような配列とは、1つあるいはそれ以上のアクリオチドの欠失、付加、または、翻訛によって異なるかも知れない。本発明の1本鎖DNAは、一般に少なくとも8タクソオチドの長さを持ち（望ましいのは、少なくとも8タクソオチドの長さ、そして常に望ましいのは30タクソオチドの長さ）、遺伝子あるいはcDNAの全長に及ぶこともある。これらはハイブリッド形成プローブとして用いるため、突出され易いように標識されていることが望ましく、また、アンチセンスのこともあり得る。出来れば、この分離されたDNAは高度繁縝度以下に、図1（配列番号（以下、SEQ ID NO.で書す）: 1）、図2（SEQ ID NO.: 2）、図3（SEQ ID NO.: 3）、あるいは図4（SEQ ID NO.: 4）に示されているDNA配列の全体、あるいは一部とハイブリッドを形成することが望ましい。「高純度」とは、例名がヒト脳膜のPTGレセプターとDNAの分離のための以下に記載されているような条件を意味する（Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987）。

が哺乳類（ヤギラム、ラットあるいはヒト）であり、DNA配列が図1（SEQ ID NO.: 1）、図2（SEQ ID NO.: 2）、図3（SEQ ID NO.: 3）、あるいは図4（SEQ ID NO.: 4）に示されているアミノ酸配列を本質的にすべてコードしてあり、あるいはアミノ酸配列（Type A Culture Collection (ATCC) に登録され、ATCC登録番号6Bも7Bあるいは6B&7Bと名付けられているプラスミドの1つのコーディング配列によってコードされていることである。本発明のDNAは、この発明の細胞レセプター（例えば、副甲状腺ホルモンレセプター）、あるいはそのレセプターの断片をコードするDNA配列を含むあるベクター【それは精製品（例えば、ライプラリーを形成するベクターの混合物から分離されたあるベクター）として提供されるかもしれない】は、及びそのベクター（あるいは上記の分離されたDNA）を含む物質、または本質的に相同な物質混群（例えば、原核細胞、あるいは乳酸菌細胞のような異核細胞）に組み込まれることもあり得る。「本質的に相同」とは、少なくとも95%の組成が本発明のベクター（あるいは、場合によっては分離されたDNA）を含むことを意味する。望ましいのは、このベクター（例えば、大鼠L929）が副甲状腺ホルモンレセプターの発現を（例えば、ベクターを導入され、あるいはベクターで転写粘附された細胞に）示す能力を持つことである。

別の観点から見ると、本発明は、即時レセプターをコードしている既知のDNA分子の発現によって生成される細胞レセプター、望むべくは副甲状腺ホルモンレセプター（あるいはそれを本質的にコードされた遺品）を模倣とする。「本質的に構成された遺品」とは、それが自然界下では含している蛋白質や組成を本質的には含まない遺品のことである。

開拓した観点からは、本発明は、自然状態下に存在するこの発明の細胞レセプターの断片を含むオリベプチドを模倣する。望ましいのは、このオリベプチドが、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン開拓蛋白質と競争する能力を持つ自然状態下に存在する副甲状腺ホルモンレセプターの断片を含むことである。好適な質膜細胞では、この断片は少なくとも6つのアミノ酸の長さで、以下のグループから構成された配列を持つ。

## 特許平6-506598 (5)

(a) TNETREREVFDRLCMIVTVG; (SEQ ID NO.: 5)  
 (b) YLYSGFTLCEAARRLTEEEL; (SEQ ID NO.: 6)  
 (c) VTFFLYFLATNYWIEVEG; (SEQ ID NO.: 7)  
 (d) Y-RATLANTGCWDLSSGKXWIIQVP; (SEQ ID NO.: 8)  
 (e) PYTEYSCTLWQIQMHYEM; (SEQ ID NO.: 9)  
 (f) DDVFTK2EQ!FLLKPAQA; (SEQ ID NO.: 10)  
 (g) PFRLLHCTRNY; (SEQ ID NO.: 11)  
 (h) EKKYLWGFTL; (SEQ ID NO.: 12)  
 (i) VLATKLRETNAGRCCTDQQYRKLLK; (SEQ ID NO.: 13) あるいは  
 (j) 断片(即ち、少なくともも既存の断片を持つか、全体よりは短い部分)あるいは(i) - (j) の組合体(アナログ)で、別明状態ホルセン、あるいは既存状態ホルセン和凍蛋白質(ここで「既存蛋白質(アナログ: analog)」とは、それが既存体であるペプチドと少なくともも0% (そして望ましいのは少なくとも70%) 同じ配列を持つペプチドを含む)を組合する能力を持つもの。出来れば、本発明のオリベブチドは既存のDNA分子の範囲によって合成されるか、または合成品(即ち、生物的よりも化学的な手段によって組み立てられた)であることが望ましい。本発明はこのようなオリベブチドを生成する方法を提供し、この方法には、本発明の細胞レセプター、あるいはレセプターの断片等コードしている分離されたDNAを組合細胞を供給すること、及びこの細胞を、分離されたDNAからオリベブチドの発現を司制するよう条件付で培養することが含まれる。

本発明は、また、この発明の細胞レセプター(出来ればヒトのPTTHレセプター)のような別明状態ホルセンレセプターと免疫結合能を形成する能力のある抗体

体(即クローンまたは多クローン性)及び抗体の粗製標品を特徴とする。このような抗体は、抗原として(1)本発明の細胞レセプターの断片を含むオリベブチド、あるいは(2)細胞表面に存在する本発明の細胞レセプターを用いることによって生成される。この抗体は、出来れば、本発明の細胞レセプターの断片(即ち、レセプターにそのリガンドが結合する時、レセプターによって本引されこされるカスケード反応の一環を誘導するもの)を中心(即ち、部分的に、または完全に組合する)する構造を持つことが望ましい。前述の実施形態において、本発明の抗体は別明状態ホルセンレセプターと免疫結合能を形成する能力を持ち、PTTHレセプターの生物学的活性(即ち、アデニル酸シクラーゼの活性化、あるいはヌクレオペラーゼCの刺激)を中和することが出来る。

また本発明には、製薬上外資出資の組合体中に、(a) 本発明の細胞レセプター、(b) ヒトの細胞レセプターの断片等)を持つオリベブチド、あるいは(c) 本発明の細胞レセプターに対する抗体を含む免疫複合物が包含される。これらの抗体複合物は、本発明の細胞レセプターのリガンドによる過剰刺激を抑制する能力の実験を遮断する効果を有する。好適な実施形態において、本発明のオリベブチドにはPTTHレセプター、PTTHレセプターの断片、及びPTTHレセプターと免疫複合能を形成する抗体が含まれる。これらのオリベブチド及び抗体は、PTTHあるいはPTTH等に接觸する高カルシウム産生の蛋白質、これとは関連のないものと並列するための診療用具として有用である。

本発明の技術ワープは、遺伝子生物学の一般知識を基に、細胞レセプターの抗体、あるいは本発明の細胞レセプターに関連した、いかなる動物由来にせよ、その細胞レセプターを測定し、クローニングすることを可能にし、本発明の起因の有用性を強大にする。

本発明の他の特徴と利点は、以下の詳述な実施形態の説明と特徴の範囲から明らかになるであろう。

## 発明の詳細な説明

先ず、他の簡単な説明をする。

1

図1はオギヤムの野菜のPTH/PTTH/PTレセプターカローン、OK-1Hをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である(SEQ ID NO.: 1)。

図2はオギヤムの野菜のPTH/PTTH/PTレセプターカローン、OK-1Oをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である(SEQ ID NO.: 2)。

図3はラットの骨のPTH/PTTH/PTレセプターのカローン、R15Bをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である(SEQ ID NO.: 3)。

図4はカローンOK-1O及びR15BからのcDNAにコードされている推定アミノ酸配列の比較である。

図5はOK-1O、OK-1HとR15Bの推定アミノ酸配列を配列相図に絞って並べて比較したものである。

図6はヒトのPTH/PTTH/PTレセプターをコードしている核酸とアミノ酸配列の表示である(SEQ ID NO.: 4)。

図7はラットの骨のPTH/PTTH/PTレセプターとのDNA、ヒトのゲノムDNAカローン及びヒトのPTTR/PTTH/PTレセプターをコードしている2つのcDNAカローンの略図である。

図8はヒトの野菜のPTH/PTTH/PTレセプターの推定アミノ酸配列の露水性プロットである。示された露水性アミノ酸(メチオニン～リジン)が示されている。A、B、Cは追加の露水性位置を示す。

図9はOK-1Hを移入したCOS細胞へのPTTH/Pの結合を示すグラフである。

図10はOK-1Oを移入したCOS細胞におけるN1+PTTHによる細胞内遮断カカルシウムの割合を示すグラフである。

図11はOK-1Oを移入したCOS細胞へのPTTH/Pの結合を示すグラフである。

図12はOK-1Oを移入したCOS細胞におけるN1+PTTHによる細胞内遮断カカルシウムの割合を示すグラフである。

図13はR15Bを移入したCOS細胞へのPTTH/Pの結合を示すグラフである。

ある。

図14はR15Bを移入したCOS細胞におけるN1+PTTHによる細胞内遮断カカルシウムの割合を示すグラフである。

図15はOK-1H、OK-1O、あるいはR15Bを移入したCOS細胞におけるN1+PTTHによるイノシトールリン脂質代謝の割合を示すグラフである。

図16はCDM-B、OK-H、R15Bを移入したCOS細胞におけるN1+PTTHによるサイタリックAMP割合を示すグラフである。

図17はヒトの骨盤(AとC)及びラットの骨(BとD)のPTH/PTTH/PTレセプターを一過性に発現しているCOS細胞への<sup>125</sup>I-標識P<sub>2</sub>H(1-34)(AとB)及び<sup>125</sup>I-標識PTH<sub>1</sub>P(1-36)(CとD)の結合を示すグラフである。結合するリガンドには、PTH(1-34)(□)、PTH<sub>1</sub>P(1-36)(○)、PTH(3-34)(△)、PTH(7-34)(+)が含まれる。データは特異的結合のパーセントとして示され、少なくとも3つの独立した実験の平均値±標準偏差を示すものである。

図18はヒトの骨盤のレセプターを一過性に発現しているCOS細胞における細胞内cAMPの蓄積割合を示すグラフである。データは平均値±標準偏差を示し、少なくとも3つの独立した実験を示すものである。

図19はヒトの骨盤(A)とS-100-2期細胞(B)から作られたmRNA(~10ug/レーン)のノータンプロット分析の結果である。プロットはヒト骨盤のPTH/PTTH/PTレセプターをコードしている完全長のcDNAをハイブリッドを形成した。28Sと18SのリボソームRNAバンドの位置が示されている。

図20はヒトのゲノムDNAをS-100-2期細胞(~20ug/レーン)で消化したもののテザーンプロット分析の結果である。プロットはヒトの骨盤のPTH/PTTH/PTレセプターをコードしている完全長のcDNAとハイブリッドを形成した。

図21はR15Bによってコードされているラットの骨のPTH/PTTH/PTレセプターの細胞株におけるRNA発現の略図である。

## 特表平6-506598 (8)

## 材料と方法

二級：(N<sub>1</sub>-e<sup>3-18</sup>, Tyr<sup>34</sup>) bPTH (1-34) アミド(PTH (1-34)), [N<sub>1</sub>e<sup>3-18</sup>, Tyr<sup>34</sup>] bPTH (3-34) アミド(PTH (3-34))及び(N<sub>1</sub>-e<sup>3-18</sup>, Tyr<sup>34</sup>) bPTH (7-34) アミド(PTH (7-34))はBachem Fine Chemicals, Torrance, CAから購入した。[Tyr<sup>34</sup>] PTHrP (1-36) アミド(PTHrP (1-36))は記載(Kentman et al., Endocrinology 117: 1230, 1985)されているように、Applied Biosystems Synthesizer 430Aを用いて合成了。グルペッコ強酸イーグル培地(DMEM), EDTA/トリブンジン及びゲンタマイシンはGIBCO (Grand Island, NY) から、牛の見血清(FBS)はHyclone Laboratory, Logan, UTから入手した。ヒト脳の總RNAはスエーデン、ウツラ、大西洋のPeter Bellmann氏によって合成された。オリゴヌクレオチドライマーはApplied Biosystems 380B DNA Synthesizerを用いて合成した。対象物質、クレノフ酢酸、T4ポリヌクレオチドナービとT4DNAリガーゼは、New England Biolabs, Beverly, MAから購入した。牛のアルカリキヌクレオチダーゼは、Boehringer Mannheim, ドイツから購入した。すべての他の試薬は入手可能な段階のものであった。

## 細胞

使用された細胞には、COS細胞、OK細胞、S49細胞、CRL細胞、A549細胞、LLC-PK1細胞及びUMR-106細胞が含まれ、American Type Culture Collection (Rockville, Maryland), 受託研究、夫々、CRL1650, CRL6551, HTB85, CCL61, CCL89, CL101及びCRL1161を含む種々の株22種から入手した。RCS17/2及びROS 17/2, 8MC Ideon Rodan博士(Merck Laboratories, West Point, PA)を含むいくつかの供給者から入手した。MC-3T

3細胞はマックスの分量から購入されるが、皮膚癌細胞(SV40, 頭頸部癌細胞、日本)も会心選々の供給者から入手出来る。

すべての細胞は複数回の空室、CO<sub>2</sub> 5%を含む気相で増殖され、牛の見血清(M. A. Bioproducts, Walkersville, MD)を5%、あるいは、10%添加したハムF-12培地、あるいはウシ胎盤液(Grand Island Biological Co.)で増殖培養として実行された。培地は3乃至4日ごとに交換され、細胞は2月至3週ごとに凍結の方法を行い、トリプシン処理によって細胞分裂された。

## クローニング

ラット及びオオサカマのPTH/PTHrPレセプターをコードしているcDNA

## N末端の分類

mRNAは、最初にラットの骨内膜(OS)細胞(OS 17/2, 8)とオオサカマの脳質(OK)細胞から、グアニジンソチオシアートを用いる標準法(Ullrich et al., Science 196: 1313, 1972; Chirgwin et al., Biochemistry 24: 5294, 1979)と強化セシクム古河の脱脂心臓(Gibson et al., Biochemistry 13: 2633, 1974)によって分離された。次いでmRNA+RNAs(mRNAs)は、AviitとLeder(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 14087, 1972)の方法により、mRNAとオリゴdTカラム(Pharmacia, Piscataway, NJ)を走した後回収された。ROS 17/2, 8 mRNAからのcDNAライブリーは、オリA+RNAからGublerとHofmann(Gene (Amst.) 25: 263, 1983)の方法を用いて作られた。オリゴdTをプライマーとする、スクリーニングプライマーをプライマーとするcDNAは、夫々、オリA+ROS 17/2, 8及びOK細胞のmRNAから合成された(AviitとLeder, 前記)。cDNAはBamHIリンクマー(Invitrogen, San Diego, CA)に連絡され、5-20%の硫酸カリウム古河の脱脂心臓(3時間、5%、0.002M)によってサイズ選択が行われた。サイズ選択されたcDNAは、次い

て、#02アーリングBと#1制限部位を用いてプラスミドベクター、pCDNA1 (Invitrogen) に導入された。その結果得られたプラスミドライブリーは、次に、より大きなヘルペスウツミド、p3を持つE. coli (MC1061/P3, Invitrogen) を形質転換するのに用いられた。p3プラスミドは、2つの導入子にアンバーフィオニン及びテトロサイクリン耐性をコードしている。アンビリレン及びテトラサイクリンを用いること、p3とpCDNA 1内に含まれているtRNAをアラブレッサー導入子の両方に付した細胞のみが成長することが出来た。選點した細胞は、次いで供給者まで検索され、プラスミドcDNA標準試験(例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley Sons, New York, 1989)を経たことにより分離された。これらcDNAは、次いでDEAE-DNAストラクチャ液中に取り込まれ、予め“サイドフラスク”(Nunc, テンマーク)内でアラルの液槽液にまで充満されたアフリカミドモザルの青酸(CDS)液槽に投入するのに用いられた。

ROSあるいはOK細胞の標準的に完全な用甲狀腺ホルモン/用甲狀腺ホルモン過量由来(PTH/PTHrP)のレセプターを発現する能力のあるプラスミドを含むCOS細胞のスクリーニングは、Gearingらの方針(EMBO J. 1, 且: 3676, 1989)に従い、これにサイドフラスク中でのDEAE-DNAストラクチャ液を入れないままの変法を加えて行った。導入して48時間後、細胞は既述の方法(Yamamoto et al., Endocrinology 122: 1028, 1988)を用い、ただし別途として、125I-インキュベーションの時間と濃度は、夫々、2時間と置換にて更に、[Tyr<sup>34</sup>] PTHrP (1-36) アミドとの結合像を検査された。検査、細胞は1-25%のグルタルアルデヒドで固定され、1%のゼラチンで脱水された。サイドフラスクの先を切った後、残りの断面側面をスライドをNTB-2写真用乳液(Eastman Kodak, Rochester, NY)に設した。4で2-40倍反応後、スライドは脱保、固定され、そして0.02%のトリマレートマレ酸で洗浄された。エヌクライドのスクリーニングは光学顕微鏡

(オリンパス)下で行われた。ROS細胞からのプラスミド-DNAの1ブール及びOK細胞からのプラスミド-DNAの2ブール、(10,000倍の分立クローン)から、夫々、PTH/PTHrPレセプターを発現している3-4個の移入されたCOS細胞が得られた。これらのブールは後に再分割された。サブブルーはCOS細胞に導入するのに用いられ、そして両者のクローンは、欲したサブクロードを結合することの出来るレセプター遺伝子を発現することが確認された。

上のPTH/PTHrPレセプターをエンコードするcDNAとゲノムDNA

2クローンの分類

ラムGT10中のヒト脳のオリゴdTをプライマーとするcDNAライブリー(1.7×10<sup>6</sup>独立クローン)及びEMBL3 (SP6/T7) (Ciontech, Palo Alto, CA)中のヒト胎盤DNAのゲノムライブリー(1.2, 5×10<sup>6</sup>独立クローン)は、<sup>32</sup>P-脱溝(ランダムプライマーをプライマーとする構成キット、ベーリングー、サンハイム、ドイツ)されたBamHI/HpaII 1, 8kbの細胞酵素断片で、ラットの骨のPTH/PTHrPレセプターをコーディング配列の大部をコードしているもののプライマーハイブリッド形成法(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2版, 108-123頁, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)によってスクリーニングされた(図3)。ニトロセルロースフィルターは、50%ホルムアルド、4%食塩(0.1molナトリウム(3SC); 1<sub>x</sub>SSC: 300mM NaCl, 1, 30mM(1×)エチナトリウム、pH 7.0)、2×デンハルト液、10%脱脂テキストラン、100μg/mlのサケ精子DNA(最終濃度)を含むハイブリッド形成液中、42℃で4時間インキュベートした。ハイブリッド形成は、同じ液槽中で42℃で18-24時間行われた。フィルターは、2×85°C/0, 1% SDSで露光で30分間、次いで、1<sub>x</sub>SSC/0, 1% SDSで45℃で30分間洗浄した。フィルムは、感光スクリーンを用い、-80°Cで8-12時間、露出した。

各ライブリーから、約百万枚のクローンがスクリーニングされた。活性のク

## 特表平6-506598 (7)

(16) ローンはブラーク法で精製され、ラムダファージDNAが分離された (Sambrook et al., 上記)。クローン化された導入菌片は、ファージDNAから、初期酵素エンドヌクレオーゼ HNase I および HNase R1 (ラムダGT10ライブラリー)、あるいはXba I (カシオペイア) (EMBL3ライブラリー) を用いて取り出され、次いで過当な脱リン酸化された初期酵素部を用いてcDNA (Invitrogen, San Diego, CA) 中にサブクローンされた。CpGIC<sub>2</sub> (帝人呂紀) で精製されたサブクローンの配列決定は、Sanger法 (Sanger et al., Biochem. 14: 5463, 1977) の方法に従い、ソノオキシターミネーション法 (Sequenase Version 2 sequencing kit, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH) によって行われた。

## 逆転录とポリメラーゼ链鎖延伸 (PCR)

(17) 3 μgのヒト骨髄由来のポリ(A)+RNA (Clontech, Palo Alto, CA) を 73, 5°C の水の中で 100°C で 30秒インキュベートし、冰浴して反応を止め、20 μlの5×RT扩增液 (Ex-RT扩增液: 40mMトリス緩衝液, pH 8, 2, 40mM MKC<sub>1</sub>, 6, 6mMMgCl<sub>2</sub>, 30mMジチオトレイトルと各5mMのデオキシタケロシド三リン酸 (dNTP))、2 μl (4单位) のRNaseH (Promega Biotech, Madison, WI)、2 μl (80 pmol/μl) のヒトcDNAプライマー H12 (5'-AGATGAACTCTGCACGT-3'): SEQ ID NO.: 14) と 80単位のトリプトキニン誘導ウイルスの逆転写酵素 (Life Sciences, St. Petersburg, FL) に加えた。反応混合物を42°Cで40分間インキュベートした。次いで、10分の1倍の最終的核酸を含むする反応混合物は、PCRにより、3 mM MgSO<sub>4</sub>、200 μMのdNTP、2.5UのVent(ボリメラーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA) を各2.5 μMの正方向と逆方向のプライマー (FC 6, BC 6, BC 7) に加え、1%の琼脂糖ゲル (Agarose Gel, 1.5%) の混合液、滅菌、1分間、94°C; フューリング、1分間、50°C; 灰化、72°Cの条件で、延伸、1分間、94°C; フューリング、1分間、50°C; 灰化、72°Cの条件で灰化した。

(18) で3分間 (40サイクル) を含む条件を 100°C の中で処理された。

2つの独立したPCRは、以下の2つの異なる正方形のプライマーを用いて行われた: (1) 2つの以前にクローン化されたSH/NPを含むプレヤブラー

G CC

(上記) コーディング末端に基く変性プライマー-PK-1 (5'-CCATTTCATGGGAGCGGCGC-CUGAT-3': SEQ ID NO.: 15)、及び、(1) セトゲノムクローンSH/NPの5'-非コーディング領域に基づくプライマー-PR-2 (5'-CCGGATCCCCCGGCCCTA-GCCGCT-3': SEQ ID NO.: 16)。両PCR反応はヒトのPTTH/PTHrPレセプターのコーディング領域の713~731番目のヌクレオチドを撰す逆プライマー-H26 (5'-AGTATAACGGCTCTTGACGA-3') を用いた (図4)。PCRの生成物はクレブー色素により検索する手前にされ、EcoRVで切断されて、脱リン酸されたpcDNAにクロニ化された。

(19) ノーザンプロット分析: 总RNAは SDS-2%パーカーヒト酵母からグアニジノウムカシアネット法 (Chen & Srinivasan et al., Biochem. 18: 5294, 1979) によって抽出された。ノーザンプロット分析のため、~10 μgの純粋RNAが、5% (3.7% ウルムアルデヒドゲル上での電気泳動にかけられ、ニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell, Eschwege, NH) にプロットされた。ハイブリッド化反応はフージライブラリースクリーニングの条件と同じであった (上を見よ)。フィルターは、0, 5×SSC/0, 1% SDSの希釈洗浄条件で30分間、60°Cで洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

(20) ナザンプロット分析: ヒトゲノムDNAと SDS/プロセイテーゼ混合 (Gross-Bellard et al., Eur. J. Biochem. 36: 32, 1973) を用いて生成された。サザーン分析のため、~10 μgのDNAsは、S1nuc及びXba Iによって消化され、0, 8%アガロースゲル上の電気泳動にかけられ、ニトロセルロース膜 (Schleicher &

(21) Schull, Keene, NH) にプロットされた。ハイブリッド形成条件はフージライブラリースクリーニングの場合と同じであった (上を見よ)。フィルターは、0, 5×SSC/0, 1% SDSの希釈洗浄条件で30分間、55°Cで洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

## 結果分析

COS細胞に発現されたクローン化レセプターの量的・量的結合を検討する実験には以下のものが含まれた:

1) PTHとPTHrPの断片及び類似体の結合。

1.1) PTHとPTHrPの断片及び類似体によるサイクリックAMP産生の測定。

1.1.1) PTHとPTHrPの断片及び類似体による細胞内の蓄積カルシウムの増大、及び

1.1.2) PTHとPTHrPの断片及び類似体によるイノシトールリン酸代謝の活性化。方法論は次の通りである。

## ラジオラセプター洗浄

[NI<sup>3</sup>I, NI<sup>131</sup>I, Ty<sup>32</sup>I] bPTH-(1-34) FR (NI<sup>3</sup>I PTH), 及び [Ty<sup>32</sup>I] PTHrP (1-36) FR (PTHrP) は Na<sup>125</sup>I (約40 Ci, New England Nuclear, Boston, MA) により被標 (Segre et al., J. Biol. Chem. 254: 6980, 1979) に従ってヨード化され、逆相HPLCによって精製された。精製に述べると、標識されたペプチドは0, 1%のトリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解され、C<sub>18</sub>-Sep-pakカラム (Waters Associates, Inc., Milford, MA) にかけられ、0, 1%TFA中60%アセトニトリル溶液によって洗出された。逆相洗浄液、ランオリガンドは、次いで、C<sub>18</sub>-Sep-pakカラム (3, 9cm × 30cm, Waters Associates) にかけられ、0, 1%TFA中30~50%のアセトニトリルの直線性勾配を用い、2ml/1分の速度で30分かけて洗出した。ラジオシグナルは、2つのピークに別れて検出した。母

初のピークは約38%のアセトニトリルのところで検出し、より高い親結合と特異的結合を示したので、この研究に用いられた。比活性は約0.0075 mCi/mgで、これは平均のヨードペプチド比に相当する。

COS-7細胞は1.5 cmのプレートで、DMEM、10%の胎牛血清 (FBS)、10mM L-シアンタミシン、80~90%の密閉度まで培養された。DEAE/デキストラン法 (Sambrook et al., 上記) により1~2μgのプラスミドDNAを投入した24時間後、細胞をトリプシン処理し、多穴プラスチック皿 (底面16あるいは3孔用、Costar, Cambridge, MA) に、液体密度 $\lambda \times 10^4$  脱離/cm<sup>2</sup>で再配分した。細胞数は移入後わずかに増加したのみであった。更に培養を48時間続けた後、ラジオレセプター洗浄が行われた。培養地は、研究細胞濃度、5.0 mMトリス-塩酸 (pH 7.7)、100 mM MNC<sub>1</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM KCl、0.5%熱可溶性牛胎盤血清 (CICO)、5%熱可溶性ウマ血清 (KCBS) および胎児牛血清 (FBS) を含む培養液と交換された。特に消毒のない限り、研究細胞、細胞をこの培養液中、15°C、4時間、4×10<sup>6</sup> cpm/ml (9, 6 × 10<sup>11</sup> dpm) の[<sup>3</sup>I]-標識のNI<sup>3</sup>I-PTHあるいはPTHrPとインキュベートして行われた。

インキュベーションは、細胞数を吸引除去し、培養液細胞を含む培養液を0, 9%NaCl溶液で振り廻し (3回)、1.5 mlにわたって洗浄することによって洗浄させた。細胞に結合した放射性は、各ウェルに液体 (3ml) INNACL (200 μl) を加えることによって回収された。空出で30分後、このNaCl溶液はガラス室に移された。二回目、三回目のINNACL (200 μl) による抽出を、一日目のものと合わせ、総放射能はタースペクトロメーター (Packard Instruments, Downers Grove, IL) で測定された。細胞を含む培養液へのトレーラーの付着は、たとえ空室が培養地とプレインチャーベーションされても、检测出来る程度であった (加えられたラベルの0, 2%以下)。

## cAMP産生の測定

細胞内cAMPの蓄積は既述 (Abou-Samra et al., J.

## 特表平6-506598 (B)

22  
B101, Jpn. c. m., 262: 1129, 1986) のようにして測定された。24穴プレート内の細胞を0, 1%BSAと2mM cAMPを含む培地で洗浄した。次いで、細胞はPTXまたはPTX+rPと15分間、37度でインキュベートした。上清を除き、細胞は直ちにプレート全体をドライアイス粉末中に保くことによって凍結した。細胞内cAMPは1mlの5.0mM HClにて細胞を溶かすことによって抽出され、抗cAMP抗体(例: Sigma, St. Louis, MO)を用い、特異的ラジオイムノアッセイによって分析された。cAMPの代わりにトレーザーとして用いたれたcAMP類似体(2'-O-メノノサクシニル-アチノン3': 5'-サイクリックモノノリノ酸トリルメチルエスチル、Sigmaより購入)は、クロラミンT法によりラウ化された。過剰のヨウ素は、ヨウ化されたcAMP類似体を1.8gセタードKカートリッジ(Watson, Milford, MA)に吸着することによって除去了。  
dH<sub>2</sub>Oで洗浄後、ラウ化cAMP類似体はS-p-p'二カートリッジから40%アセトニトリル(ACN)と0, 1%トリフルオロ酢酸(TFA)によって抽出された。ヨウ化cAMP類似体は直接乾燥され、3mlの0, 1%TFAにもどし、C18逆転FPLCカラム(Watson)に注入された。カラムを0, 2.0%ACNの1%TFA溶液で平衡化し、0, 1.5%TFA中、10-30%ACNの浓度勾配で洗浄した。この操作によりモノヨウ化cAMP類似体を、ヨウ化cAMP類似体から分離することが可能となる。トレーザーは-20度で保存する時は、4ヶ月まで安定である。アッセイに用いられた標品、アチノン3', 5'-リン酸はSigmaから購入した。試料(1-10μlのHCl)抽出液あるいは標品(D, 0.04-100μlの1/ナビューブ)を50mM酢酸ナトリウム(pH 5.5)で稀釈し、トリニチルアミンと相溶性の混合物(容量比 2:1 10μl)でアセチル化した。アセチル化後、cAMP抽出液を、PBS(pH 7.4)、5mM EDTA及び1%正味ウサギ血清中に作られた保存(1:40000)から抽出した。トレーザーは、0, 1%BSAを含むPBS(pH 7.4)で希釈して加えられた(20, 000cpm/ナビューブ)。アッセイは4度で一組インキュベートした。結合したトレーザーは100μlのヤギ血清ウサギ抗血清(1:20, PBS中)及び1mlの7%ギリヌレンジリッ

ール(分子量5000-6000)を加えて沈殿させ、2000rpmで30分間、4°Cで遠心した。上清を除き、結合した放射能をターコウンター(Micromedics)で測定した。頂部面積はMicromedicsから提供された4-エチメチル-R18プログラムを用いて算定した。真密度的な値は、アッセイ密度は0, 1fmol/ナビューブで、トレーザーの50%を置換する標準濃度は5fmol/ナビューブである。

cAMP基質をアッセイする測定では、PTX/PTX+rPレセプター-cDNAを導入されたCGS細胞は、プラスチックポリスマンによって、1.0mMトリス-緩衝( pH 7.5)、0, 2mM MgCl<sub>2</sub>、0, 5mMエチレングリコールピス(2-アミノエチル)N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)(Sigma)と1mMジオキタレイト(Sigma)を含む培養液に溶解される。細胞は緊密に合ったグランクモジュライザーの20ストロークゼロジルナイスし、1.3, 0.010gを1.5分間で遠心する(Eppendorf, 5412R)。Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY)。脂質質を含むペレットはダブルスホモジナイザーで破壊ストロークにより同じ細胞液に再溶解し、更に同様操作で溶解して蛋白質濃度を、Lowry et al., J. Biol. Chem. 193: 265, 1951)で測定して約1, 2mg/mlとする。約30mg(25cm<sup>2</sup>)の液を、種々の濃度のキラモン、または液体のみと10分間、37°C(液体温度: 100μl)T、5mMトリス-緩衝(pH 7.5)、0, 8mM ATP、4×10<sup>-6</sup>cpm(ε=32P)ATP(New England Nuclear, Boston, MA)、9mMテオフィリン、0, 2mM NaCl<sub>2</sub>、26mM KCl、0, 12%BSA、及び5mMクレアチンリニン酸(Schwarzs/Mann Division, Becton-Dickinson & Co., Orangeburg, NY)とクレアチニンホスホキナーゼ(Schwarzs/Mann)を含むATP活性系とインキュベートする。インキュベーションは、液熱滅菌を通過することによって開始され、100mlの20mM cAMP、約50, 000cpmの[<sup>3</sup>H]cAMPと80mMATPを含む培養液を加えることによって終了させる。次に混合物を静置し、生

23  
産された[<sup>32</sup>P]cAMPはイオン交換カラム(Dowex 50 W-X4, BioRad Lab., Richmond, CA)とアルミニウム(Sigma)上の逆流カラムクロフトグラフィーによって精製される。[<sup>32</sup>P]cAMPはオーシンチレーションカウンター(Packard Instrument Co.)で、[<sup>32</sup>P]cAMPの回収に対する検定をして測定される。

## 細胞内cAMPの測定

PTX/PTX+rPレセプター-cDNAを導入された細胞の細胞内セルシウムレベルの測定は、Fura-2 AM(Fura-2のアセトメトキシエスチル, Molecular Probes Inc., Eugene, OR)を負荷した初期を用いて行われた。方法論の詳細は以下の通りである:

COS細胞を坐立したガバーガラスを、Fura-2 AMを負荷し、以下のものを含む(細胞密度)培養液でインキュベートした: HEPES(N-12-ヒドロキシニトリル)ペペラジン-N'-[(2-エクシスルホン酸)]、20: CaCl<sub>2</sub>, 1: KCl, 5: NaCl, 145: MgSO<sub>4</sub>, 0, 5: NaHCO<sub>3</sub>, 25: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1, 4: グルコース, 10: 脱炭酸ガス-2 AM(1-(2-(5'-カルボキシオキシチオグリール-2'-イル)-5'-クノベソフラン-3-ラ-オキシ)-2-(2'-アミノ-5'-メチルオキシ)エタノール, N, N', N'-四酢酸ベンツアセトキシメチルエスチル), 0, 5: 37°Cで10, 4, 9.5%空気と5%CO<sub>2</sub>と345分間通した。Fura-2 AMを負荷した細胞は、次いで、以下のものを含む(mM濃度)修正クレブス-ヘンゼライト(KBS)培養液で洗浄した: HEPES, 20: CaCl<sub>2</sub>, 1: KCl, 5: NaCl, 145: MgSO<sub>4</sub>, 0, 5: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1: グルコース, 5: DHT, 5. エステルの開裂が起きたことをチェックするために、Fura-2 AMインキュベーション後、時間を使って初期スペクトルを測定した。インキュベーション開始後10分で、初期スペクトルは約1600nmにピークがあり、Fura-2 AMの不完全な脱水分析を反映していたが、10分を経ると、初期スペクトルはFura-2の特徴である約345nmにピークがあった。  
細胞の細胞の活性を測定するために、ガバーガラスを振盪物の細胞チャンバー

Biophysics Technologies, Inc., MD)に置いた。チャンバーは、シリコンラバーシールを持つチフロン型の蓋、瓶の付いたコンパートメントからなっていた。ガバーガラスはチャンバーの底の使用をした。ガバーガラスを規定の場所に密着させるシリコンラバーには、ヒーター/クーラーリングが計り込まれていた。温度はヒーターに0-7, 4ボルトを加えることによって、22度~37度の間に調整された。温度を特定しない限り、実験は37度で進行された。チャンバーは創立即断組(Zeiss, J.M.-35, Thornwood, NY)の装置台に載せた。Fura-2の蛍光のために、コンデンサー(Photon Technologies International, NJ)の焦点におかれられた7ラットのキセノンアーチ灯で励起された。吸収が過剰光分光器と交差する回転チャッパーによって吸収される回折光子半強光分光器が、吸収極端に配置された。非色光分光器の出力は集光されて一本の光路の光路を形成し、細胞可能な軸移動して光路のハウジングを通過した。次いで、光は石英レンズを、そして100倍のニコン蛍光反射レンズを通して二色性の鏡を通過した。光電子管をEDS検出器による検出が光の出力測定に使用された。データの分析は、MGR-DOS操作系を用いる1D相互換換AT/286コンピュータにRTJソフトウェアを使用して行った。データは正確二値表示形式で保存、操作された。

細胞内のカルシウム濃度は次式に従って計算された: [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>=Kd(Rm+Rl)/ (Rm+Rl-R)。ここで、Rは340と380nmにおける細胞の蛍光のRであり; RmとRlは、丸と細胞のカルシウムと実際上ゼロのカルシウムの存在下の、Fura-2の340と380nm筋屈筋膜における蛍光強度のRであり; Rは380nmにおけるゼロカルシウム存在下のFura-2の蛍光の、細胞のカルシウム存在下の蛍光に対するRであり; KdはFura-2のカルシウムに対する蛍光強度である。RmとRlを測定するために、試験の結果にイオノマイシンをFura-2を負荷した細胞に加えて細胞外(1 mM)と細胞内環境の前のCa<sup>2+</sup>を平均化した。次いで、RmとRlを計算するために、1 mMのEGTAを細胞液に加えた。RmとRl濃度では異なる解説方が用いられた: 34-37度においては2.24 mM、及び24-2

## 特表平6-506598 (9)

L アミノ酸においては 23 から 24 である。

(27) イノシトールカルボン酸の測定

PTB/PTHrP レセプターを導入された COS細胞におけるイノシトールカルボン酸の代謝レベルは既報の方法を用いて測定された (Bonaventure et al., 1990; J. Biol. Chem. 265: 4934, 1990).

(28) 組成

分子的性質

2つの別種のクローニング (OK-H 及び OK-O) は、ともに OK 頭部の cDNA ライブドライから分離されたが、およそ 2 キロベースの長さをもつていた。これらのクローニングの決定されたスクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は、次の如く (SEQ ID NO.: 1) 及び図 2 (SEQ ID NO.: 2) に示されている。COS細胞の cDNA ライブドライから分離された R1582 ニーンは、およそ 4 キロベースの長さであった。ラットの脳の PTB/PTHrP レセプターの決定されたスクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は図 3 (SEQ ID NO.: 3) に示されている。

3つの cDNA ラーメンは、イニシューター・メチオニンとして脊髄的な筋者と予想されるメチオニン残基をコードしているコドンを持つという結果によって完全な長さのものと見られる。これらメチオニン残基の後には、「シグナルペプチド」配列であることを示す性質を持つアミノ酸配列 (D-X-N) から構成されているが既く。3つのレセプター cDNA はすべて、G-蛋白質関連のレセプターに典型的なモデル、確定のアーカー・異常モデルへの「適合」を可能にする変異ビスルコドンを持つ。最も重要なことは、3つのクローニングされたレセプターが、すべて、リガンドと結合して活性化された時、細胞内のエフェクターを活性化する能力を有することである。これらの純性質は、分離された 3 つのクローニングすべてが、完全な cDNA をエンコードすることを示す。

図 4A 及び図 4B は、1582 ニーンからの cDNA によってコードされているアミノ酸配列の高度の相間性を示す。これら 2 つのレセプター間には、全体で 87% の相間性があり、また、8% のアミノ酸の一致がある。このアミノ酸の

多い範囲にわたっての相間の一致は、PTB レセプターのアミノ酸配列が他の上位高度に保持されていることを証明している。これは、OK-O 及び R1582 ニーンからのデータをヒトを含む他の動物に外挿することを可能にする。

図 4 は、3 つのクローニングされた cDNA すべての推定アミノ酸配列を配列相図に従って一様に整列させたものである。OK-H 配列は OK-O 及び C-末端尾部を除き同一である。ここで OK-H 配列は全部で 1582 アミノ酸残基を持つが、OK-O 及び R1582 ニーンは 254 個で止まっている。これは、OK-O 配列と比べて OK-H 配列に欠けているただ 1 個のスクレオチド (G) に起因し、前者におけるフレームシフトと共に残る終止コドンの変換となっている。OK-O 及び OK-H が 2 つの別種の遺伝子の座標か、あるいは供試品の人源座標かは不明である。

C 蛋白質に共役したレセプターのいくつかは、イントロン残基の位置によつてコードされている (Kobilka et al., Nature 329: 75, 1987; Kobilka et al., J. Biol. Chem. 262: 7321, 1987; Hecker et al., M. Endocrinol., 6: 70, 1992; Kobilka et al., Science 238: 650, 1987; Bonner et al., Science 237: 527, 1987; Nabara et al., Nature 347: 80, 1990)。ヒトの PTB/PTHrP レセプター cDNA を構成するために、ヒト cDNA ティゲラリーとヒトゲノムライブドライの両者を、ラットの脳の PTB/PTHrP レセプターのコーディング領域の大部を代表するプローブ (B6H11/Nest1) を用いてスクリーミングした (図 5)。ヒト脳 DNA の cDNA ライブドライのスクリーミングの結果、クローニング H-1 が分離されるに至った (図 6) (SEQ ID NO.: 6)。タムザームの E-E-R1 クローニングサイトの 1 つが、ハイブリッド形成の結果、除去されたことが判明したので、cDNA の人前半及び 3'末端 (左) タムザームの ~250 bp を含む E-E-R1 フラグ断片を pCDNA1 の相当する位置にサブクローニングした。DNA 配列決定の結果、クローニングされた cDNA は、3' コーディング領域の ~1000 bp と、A の多い 3' - 端を含む 3' 非コーディ

(32) ング領域の ~200 bp を含むことが判明した。X 射線 X 線像に示す通り、直列コーディング領域は、次いでライブドライを再スクリーニングするのに利用され、クローニング H-1 の分離を示したが、これは、pCDNA1 へのサブスクリーニング後、コードティング領域の ~1400 bp を含むことが判明した。ライブドライの第三のスクリーニングに対しても、H-1 × 24P + 11/P = 1 が用いられた。分離されたクローニング H-1 は H-1-2 と同一であることが判明した。

ゲノムライブドライのスクリーニング (~10<sup>6</sup> プラット) の結果、4 つの独立したクローニングが分離された。これらのクローニングの初期酵素消化断片のサザーンプロット分析を示すゲノム cDNA のそれとの比較した結果、1 つの 1 号とともにゲノムクローニング BPC1 (また、BPC4 とも呼ばれる) は、S-1 で消化された正常のヒトゲノム DNA から、ハイブリッドを形成するむしろ複数同じサイズの S-1 と S-2 断片を示すことが判明した (下記参照)。S-1 と S-2 断片を構成するハイブリッドを形成する Z-3 は S-1/S-2 cDNA 断片と、~8 kb 及び ~10 kb 断片は、既に pCDNA1 にサブクローニングされた。さらに S-1 と S-2 cDNA 断片のサザーンプロット分析の結果、ある ~1000 bp の S-1/S-2 断片がヒトの PTB/PTHrP レセプターの一部をコードしており、これが、後に、確定のシグナルペプチドと ~1000 bp のイントロンによって中断されている L-1 フィードィング領域をコードしているエキソンを代表していることが判明した (図 7)。

コーディング領域の残る ~450 アクレオチドを分離するため、ヒト脳組織からのゲリ (A) + RNA を H-1 でグライミングの後、選択した (図 8)。1 本筋合収集、2 つの抽出した PCR 由以下の 2 つの測定の正方向プライマーを用いて行った：(1) 2 つの側面にクローニング末端に基づく記述プライマー RKR-1 及び、(2) EPG1 の L-1 フィードィング領域に基づくプライマー RKR-2 である。H-1 が同様の端プライマーとして用いられた。サザーンアロット法および凝胶電気分離によって、ヒトの PTB/PTHrP レセプターをコードしている既報された DNA の予想されたサイズが確認された。ヒトの PTB 及び PTHrP の L-1 末端をコードしている半島末端の L-1 が既に既報は、既報

された EcoRV 部位を用いて cDNA にクローニングされた。PCR フローリングの配列分析によって、それらの L-1 クローニングの違いは反方向プライマーの配列の違いによることが確認されたが、それ以外は同一の配列であることが明らかとなった。ヒトの PTB/PTHrP レセプター cDNA の両者のスクレオチド配列決定により、593 アミノ酸残基を持つ蛋白質をコードしている既報既報は明らかとなつた (図 6, SEQ ID NO.: 6)。

完全長のヒト脳の PTB/PTHrP レセプター cDNA、HKR-R は、PCR フローリング 2 号 H-20 及び H-1/P = 11 断片を加えて構成された。ヒトの PTB/PTHrP レセプターをコードしている完全長の cDNA を用いて、ヒト脳及ぶ CS-2 頭部からの總 RNA (~10 μg/レーン) のノータンプロット分析の結果、Z-2, S-1 の 1 つの主要なハイブリッドを形成する DNA 領域が明らかにされた (図 19)。正常のヒトゲノム DNA の X 射線 X 線像は、同じ完全長の cDNA (図 20) でプローブされると、1 つの主な約 5, 5 kb のハイブリッドを形成する様と、多くハイブリッドを形成する約 8 kb の 2 つの DNA 領域が現れた。これらのデータは、ヒトの PTB/PTHrP レセプターが即座の発達の段階であることを示唆している。完全長のクローニングは、次いで、統計的及び生物的的検査を実行するため、上述の方針により COS 制限に一過性に充満された。

ヒトのレセプターのオーバーサム製品の PTB/PTHrP レセプター及びラットの PTB/PTHrP レセプターとの比較により、大々、81% 及び 91% のアミノ酸配列の同一性が明らかになり、結果として非常に類似した酸性性プロットを示した (図 8)。すべての細胞内シテインは、選択シグナルペプチドにおける 2 つのシテイン残基を含めて、すべての可逆性のある側鎖の N-グルコサミル化部位のように、保存されている。ヒトの脳とラットの PTB/PTHrP の間で同一でないアミノ酸のいくつかは、ヒトとオオサメのレセプターの間では保存されていることが判明した。これらの保存されているアミノ酸残基は、5 位の A と 2 位の T から H と、5 位の A と 6 位の T から T と、262 位の A と 5 位の H と 2 位の T から S とである。

## 特許平6-506598 (10)

## 生物学的活性質の検出

(37) オボマツとラットのPTH/PTH-Pレセプターの生物学的性質の種差的検討の結果は一過性に導入されたCOS細胞において、放射性リガンドとして  $^{125}\text{I}-\text{PTH-P}$  と  $^{125}\text{I}-\text{Nle-PTH}$  の双方を用いるラヂオレセプターライブスキャンにより、また、リガンドによるcAMPの蓄積、細胞内カルシウムの増加、及びインシトールリシン脂代謝の促進を測定するバイオアッセイにより、上記の方法によって行われた。

(38) 図9はOK-Hを発現しているCOS細胞が、 $^{125}\text{I}-\text{PTH-P}$  を結合することを示している。これらのデータは、また、実験のPTH(1-34)、またはアミノ末端で遮断されている（即ち、3-34及び7-34粗抗体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1を残す）、そして34位のフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を行っている）PTH類似抗体が結合の競合阻害剤として用いられた場合、PTH-Pとの結合が阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への  $^{125}\text{I}-\text{Nle-PTH}$  の結合には、PTH-PあるいはPTH-P断片が結合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTHとPTH-Pは共にR1-9によってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

(39) 図10は、OK-Hを発現しているCOS細胞が、N1-ePTHに曝露されるとき細胞内の遊離カルシウムの濃度を増大するが、OK-HあるいはR15Bレセプターを発現（図12と図14）、N1-ePTHで刺激されているCOS細胞と比べると、增加の強度が低いが（平均 $\sim 39\%$ ）、あるいは全く低いことを示している。OK-HあるいはR15Bを発現しているCOS細胞とは異なり、OK-Hを発現しているCOS細胞はN1-ePTHで刺激された時、インシトールリシン酸の生成の活性は検出されない（図15）。

(40) 図11はOK-Hを発現しているCOS細胞が、 $^{125}\text{I}-\text{PTH-P}$  を結合することを示している。これらのデータは、また、PTH-Pの結合が、他のPTH(1-34)、またはアミノ末端で遮断されている（即ち、3-34及び7-34粗抗体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1を残す、そして34位にフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を行つて）PTH類似抗体が

結合の結合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同時に、OK-Hを発現しているCOS細胞への  $^{125}\text{I}-\text{Nle-PTH}$  とPTH-Pは共にOK-Hによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

(41) 図12はOK-Hを発現しているCOS細胞が、N1-ePTHとPTH-Pによる刺激後、細胞内の遊離カルシウム濃度及びインシトールリシン酸の代謝活性を増大することを示している（図13）。

(42) 図13はR15Bを発現しているCOS細胞が、 $^{125}\text{I}-\text{PTH-P}$  を結合することを示している。これらのデータは、また、PTH-Pの結合が、無傷のPTH(1-34)、またはアミノ末端で遮断されている（即ち、3-34及び7-34粗抗体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1を残す）、そして34位にフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を行つて）PTH類似抗体が結合の結合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同時に、OK-Hを発現しているCOS細胞への  $^{125}\text{I}-\text{Nle-PTH}$  の結合は、PTH-PあるいはPTH-P断片が結合阻害剤として用いられた時は、阻害された。これらのデータは、PTHとPTH-Pは共にR1-9によってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

(43) 図14は、R15Bを発現しているCOS細胞が、OK-Hを発現しているCOS細胞が刺激された場合と細胞内カルシウム活性を増大することを示している。

(44) 図15は、R15BあるいはOK-Hを発現しているCOS細胞が、N1-ePTHあるいはPTH-Pによる刺激の初期段階、インシトール三リン酸（IP<sub>3</sub>）とインシトール二リン酸（IP<sub>2</sub>）蓄積の急速な増加によって説明されるように、フェニルアラニン置換のカルボン酸濃度を増大することを示している。また、OK-Hを発現しているCOS細胞はN1-ePTH、あるいはPTH-Pによる刺激後、インシトール三リン酸とインシトール二リン酸の蓄積にいかなる増加も検出出来なかった。これらのデータは、R15BとOK-HによってコードされているPTHレセプターはホスホリバーゼCに、速らくG<sub>s</sub>を介して共

同様の活性を示すことを示唆する。OK-HとOK-Hの間の唯一の違いはC末端尾部にあるので、これらのデータはOK-HとR15BによってコードされているPTHレセプターのC末端はホスホリバーゼCの活性化に関与していることを強く示唆する。

(45) 図16は、R15BとOK-Hを発現しているCOS細胞が、N1-ePTHによる刺激後、cAMP蓄積を増大することを示している。同様の結果は、OK-Hを発現しているCOS細胞においても得られた。cDM18ベクターの名を有する導入されたCOS細胞ではcAMP蓄積は認められなかった。これらのデータは、アデニル酸シクラーゼに特異しているPTHレセプターは、レセプターのC末端の側鎖質側の完全性の喪失を必要としないことを示唆している。これらのデータは、OK-H及びR15B導入のCOS細胞のcDNAライプラリーの取扱からクローニングされたPTH/PTH-Pレセプターのすべてが、因ベブナドのアミノ酸残基のリガンドによる活性化を示すことを示唆している。リガンドによるこれらすべてのレセプターの活性化は、アデニル酸シクラーゼを、恐らくはグアニヌヌクレオチド結合蛋白質（G-蛋白質）の1つの活性化を通じて、刺激する（細胞内cAMPの増加によって測定されるように）。G-蛋白質は、三量体GDP結合型をもち、そのうち、サブユニットの1つ、アルファは、GTP、トリプトであるが、他の2つ、ベーターとガンマは同一か、または相同性が高い。これらG-蛋白質の1つ、G<sub>s</sub>はG-アルファ“刺激性”（G-アルファ<sup>s</sup>）を含み、これはアデニル酸シクラーゼの活性化に関与する。

(46) リガンドのOK-H對ではなく、OK-HとR15Bへの結合もまた、細胞内の遊離カルシウムを増加してインシトールリシン酸の代謝を測定する。これらの結果は、OK-HとR15Bレセプターのリガンドによる活性化は、特に第二の細胞内エフェクター、ホスホリバーゼCの活性をもたらすことを強く示唆している。これら活性化されたレセプターとホスホリバーゼCとの共役機構は、G<sub>s</sub>とは全く異なるG-蛋白質であるらしい。対照的に、カルボキシ末端で切り詰められている活性化されたOK-Hレセプターは、活性化された時のその性質が、ホスホリバーゼCを活性化しないか、あるいはホスホリバーゼCを効果のない活性化を示すことを示唆する。

(47) PTH/PTH-Pレセプターのカルボキシ末端尾部の生物学的役割は、既報としてR15Bを、そしてR15Bに終止コドンを挿入された上流プライマーとを用いる標準PCR法により、カルボキシ末端近傍カットレセプターを発見することによって、さらに詳しく述べた。同時に述べると、上流プライマーはダットcDNA配列（図3：SEQ ID NO.：3を見よ）の1494-1513番のスクレオチドに亘りく台成オリゴタクレオチドで、これには終止コドンとXba Iクローニング部位が加えられたものであった。30回のPCRサイクルが行われ、各サイクルは温度92°C、1分；アーニーリング60°C、1分；延伸72°C1分からなっていた。生成物はXba IとXba Iによって切断され、ゲル電気泳動によって精製された。R15Bは、Xba IとXba Iによって精製され、精製されたPCTH生合成物は、次いで、Xba I-N<sub>6</sub>-1で切断されたR15Bベクターに連続された。その後出来たプラスミド、R480は細胞中で培養され、配列が決定された。

(48) R480は、5'9'アミノ酸残基を持つレセプター中のものを同一の480のアミノ酸をコードしている。この培養cDNAはCOS-7（一過性発現）とCOS細胞（安定発現）に発現された。培養レセプター、R480と自然型レセプター、R8を発現しているCOS-7とCOS細胞は共にPTH(1-34)を用いた親和性を伴って結合する。活性化されると、R480は、正常型レセプターと同様にCOS-7とCOS細胞におけるcAMP蓄積を刺激した。正常型レセプターとは対照的に、R480はPTHで刺激された時、COS-7細胞、あるいはCOS細胞にも[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>イオンの増加を示せしなかった。これらのデータは、PTH/PTH-PレセプターによるホスホリバーゼCとアデニル酸シクラーゼの活性化に対する分子的要件はお互いに異なっていることを示唆し、PTH/PTH-Pレセプターのカルボキシ末端尾部のホスホリバーゼCとの、しかしアデニル酸シクラーゼとはない、共役における至適な役割を指摘している。一方、活性化されたPTH/PTH-Pレセプターが最初のG-蛋白質およびまたは細胞内のエフェクター分子を活性化する可燃性もまたある。

(49) クローン化されたヒトのPTH/PTH-Pレセプターを導入されたCOS-7細胞の分析によって、放射標識PTH(1-34)とPTH-P(1-36)

## 特許平6-506598 (11)

(~200,000 cpm) が発現されたレセプターに、R35D (特異的結合率・夫々、8.1±3.5%と7.1±4.1%) を発現しているCOB-7細胞に対して被誘導されたとの同様の効率 (特異的結合・夫々、1.0±3.7% と7.6±0.0%) で結合することが明らかとなった。発現されたヒトPTH/PTHrPレセプターは、ラット骨のレセプターよりも2倍高い見掛けのKdでPTH (1-34) と結合した (~5nM対~10nM (図17))。しかししながら、それらの高純度のアミノ酸組成にも拘らず、2つのレセプターはPTH (1-34) とPTH (7-34) に対する親和性に著しい差異を示した。PTHrP (1-36) はヒトのPTH/PTHrPレセプターに対し、ラットのレセプターに対するよりも2から4倍低い親和性を示した (見図20)。このことはPTH/P (1-36) がヒガオリガンドとして用いられた時の方が、E上に選択であった。PTH (1-34) 及びPTH (7-34) に対する親和性は、発現されたR35D/Kの方々2158よりも7から3倍も高かった (PTH (1-34) に対して、夫々、~7nM対~45nM; PTH (7-34) に対して、夫々、~6nM対~20nGnM)。いずれかのレセプターを発現しているCOB細胞において、PTH (1-34); PTH/P (1-36) は共に細胞内の酵素カルシウムとcAMPの蓄積を同程度に誘導した (図18)。

## PTH/PTHrPレセプターの親和性

ヒトのPTH/PTHrPレセプターのアミノ酸配列は、ラット、真珠貝扇貝からのアントドン/PTHrPレセプターと比べて、非常に高純度の構造を示すが、オボッケム、有袋動物のPTH/PTHrPレセプターとの配列の相間性はそれほど高くなはない。オボッケムの脊髄及びラットの骨のレセプターのように、ヒトの脊髄のレセプターは、PTHまたはPTHrPで誘導された時、細胞内のcAMPと遺伝のカクシームの増加を説明する。ヒトのPTH/P (1-34) レセプターとオボッケム及びラットの骨のレセプターのように、ヒトの骨のレセプターは、ラットの骨のレセプターとは異なる複数の作用を持っている。これには、PTH (1-34) に対するやや高い親和性とPTHrP (1-36) に対する著しく低い親和性が含まれる。より高い親和性はPTH

(3-34) と特にカエロ (7-34) に対して認められ、そのヒトのレセプターに対する親和性はラット骨レセプターと比較して約3.5倍も高かった。これらの見見は、PTH/PTHrP類自体の構造の既存に固有な意味を持つかもしれない。それは程度異なる組成は、インビニアーアンゴニスト (とアゴニスト) の初動活性度に対する適切な組成であることを予測するからである。

## PTH/PTHrPレセプターに対する親和性

PTHとPTHrPレセプターの生物学的活性度は、これらがG-蛋白質連携の第1型レセプターとして知られている第1型レセプター分子群のメンバーであることを示唆している。よく調べられているG-蛋白質レセプターの典型的特徴は、それらがすべて、数種の構成した酵素アミノ酸からなる少なくとも2つの領域を持ち、これらの領域の各々が原形膜膜を通過するのに十分な長さのものであることがある。

G-蛋白質連携の第1型レセプターの主なリフアミリー、細胞質ドレセプターアイソフォーミーと呼ばれるものには、細胞質ドホルモン (甲状腺刺激ホルモン、腎臓刺激ホルモン、垂体刺激ホルモン、及び成長刺激ホルモン) によって結合され、活性化されるレセプターが含まれる。これらのレセプターは、すべて以下のようないずれかがある: (1) リガンド結合ドメインの一部またはすべてを含むと思われる疎水アミノ酸側鎖のドメイン (300アミノ酸残基よりも大) を持つ。(2) 著しいアミノ酸組成を、既に、2つの活性ドメインにおける著しいアミノ酸組成に加えて、比較的短い (25-75アミノ酸) 活性アミノ酸側鎖ドメインが結合である。これらのレセプターのリガンドによる活性化には、多数の活性ドメインの内の少なくとも2つが関与すると想われる。レセプターのアミノ末端部が結合するとは思われない。

ラットのPTH/PTHrPレセプター (図3) の確定アミノ酸配列から推論され得るいくつかの相應的残基は、PTH/PTHrPが1-9のG-蛋白質連

のレセプターであること示唆している。アミノ末端は、2つの疏水性ドメイン及び3つの高度したロイシン基を含むシグナルペプチドの結合を示す。この20-28アミノ酸残基からなるアミノ酸組成は、他の報道されたレセプターの細胞外ドメインに先行するアミノ末端のように、リードア配列として設定つかない可能性はない。また、活性残基ドメインを代表する7つの酵素部位の位置がある (図19)。

オボッケムの脊髄、ラットの骨、及びヒト骨のPTH/PTHrPレセプターの示されたアミノ酸配列は、これらがG-蛋白質連携のレセプターアイソフォーミーのいずれにもうまく当てはまらないことを反映している。ラット及びヒトのPTH/P (1-34) レセプターの細胞質ドレセプター及びアドレナリン受容体/ムスカリニン受容体サブファミリーとの全般的相間性はおよそ10から20%であるが、骨髄ドメイン内の相間性はこれより低分率。このことは、これらの細胞に出て来る酵素性アミノ酸のすべては組まれているので、当然のことと予想される。20%相間性は、これらサブファミリーの夫々のメンバーとして一般に受け入れられているレセプター駆で見出される相間性よりも確かに低い。むしろ、これらの配列には、限られた領域にさえ、強い相間性 (即ち、互に合っていふるアミノ酸配列) として特徴付けられるようなものを持つ部分は全く存在しない。

新たに特徴が判明されたセクレチン及びカルシトニンレセプターとの相似の比較 (Ishii et al., EMBO J. 10: 1635, 1991; Lin et al., Science 254: 1022, 1991) によれば、これらのレセプターとPTH/PTHrPレセプターの間にには30から40%の同一性のあることが判明している。PTH/PTHrPレセプターはカルシトニンレセプターより100倍以上アミノ酸が長いけれども、オボッケム骨髄のPTH/P (1-34) レセプター (S20 ID NO.: 2) とブタ骨髄のカルシトニンレセプター (C60 ID NO.: 1) 発現番号 M74420) のアミノ酸配列の間にには~32%の一一致がある。活性残基ドメインV1の18アミノ酸のうち17の残基は同一である。また、4つのN-連続グルタル化部位のうち2つ、及び8つの細胞内アシテインとして可逆性のあるものうち

2つの位置が保存されている。2つのレセプター間の主要な差異は、それらのN端-末端とC端-末端のドメインにあると思われる。ラットのセクレチンレセプター (GenBank 登録番号 X59132) とヒトのPTH/P (1-34) レセプターのアミノ酸配列の比較により、確定残基ドメインV1の25のアミノ酸のうち21の範囲が一致している。これら2つのレセプター間に14.3%の相間性のあることが示されている。PTH/P (1-34) 、カルシトニン、及びセクレチンのレセプター間の相間性は、これららが7個残基のG-蛋白質に由来してアデニル酸シクラーゼを活性化するレセプターの新しいファミリーを代表することを示唆している。これらのレセプターのアミノ酸配列が見えられれば、この他の荷物家はこれらの配列を比較し、一致して複数プローブ設計に役立つ領域を求め、このファミリーに属する他のレセプターの機能を分離に用いることが出来るであろう。

## クローンの寄託

特許手続きの目的のための微生物寄託についての国際的規範に関するアドバイスを含む約150種の菌株が、OK-O及びOK-H: ファージNPG1: 及びヒトのクローンの一例を含むプラスミド (名前BA6) が、American Type Culture Collection (ATCC) に登録され、そこでは、夫々の登録番号ATCC No. 5857 1, 58572, 58573, 40598, 及び68570が付けられている。中研管の荷物代理人 The General Hospital Corporation は、ATCCがこの寄託の承認性と、もし、荷物が許可された場合には、その各々の特徴を提供する研究所であることを申し立てる。このように寄託物質の分離に関するすべての制限は、荷物の許可と共に改変されることなく維持される。希望は荷物申請の実決期間中は、37 CPR 1, 14及び35 U. S. C. 122の下、コピーシャーによって販売ありと決定された者に分譲される。分譲された荷物はあらゆる必要な情報を付けて封入され、荷物されたプラスミドの試験開封に対する最も新しい登録後少なくとも1年間。そして、いかなる場合でも、荷物の日付後、少なくとも30年の期間、あるいは荷物の運行

## 特許平6-506598 (12)

(45) 図面、いざれか長い方の筋肉、生赤状態で、汚染されないように保存を経験する。申請者の指定代理人は、もし、荷物の状態のために、費用があつても販売所が試料を提供出来ないならば、荷物を取扱う者に賃貸のあることを認める。

## ヨリベブチド

本発明によれば、ヨリベブチドには、図3-3及び4に示す、示されているオボッサム、ラット及びヒトの副甲状腺ホルモンレセプター、及びいかなる他の自然界に存在するレセプターに付し、これらのレセプターをクローニングして発現するのに用いられたものに類似の方法により、あるいは、ここに記載されている序列の1つの全体または部分をプローブとして利用する方法によって生成されるものを含む。さらに、副甲状腺ホルモン、または副甲状腺ホルモン同源蛋白質に対する結合能のあるPTDレセプターの粗製体あるいは断片も本発明の範囲内にある。

既知ある特異なレセプター細胞体には、固相アミノ酸配列によってのみ異なる、例えば、同じクラスの他の代わりに1アミノ酸の置換(例えば、グリシンの代わりにバリン; リジンの代わりにアルギニン、等)、あるいは、1つ、またはそれ以上の相同度アミノ酸の置換、欠失、また副甲状腺ホルモン、または副甲状腺ホルモン同源蛋白質に結合するレセプターの性力を破壊しない程度にされた導入によってのみ異なるアミノ酸配列を持つ完全形、あるいは部分形のレセプター蛋白質が含まれる。

特に同じである特異なレセプター断片には、これらに限られるわけではないが、レセプターの部分で、一次アミノ酸配列からChou-Fasman法(例えば、Chou and Fasman, *Adv. Rev. Biochem.* 47: 251, 1978参照)のような親水性/親水性計算を用いて細胞外であると既定されたものが含まれる。親水性ドメイン、特に少なくとも10個のアミノ酸からなる疎水性領域(非極、疎水ドメイン)は、細胞外ドメインの有り無しを示すとして現れて来る。図21は、1つのPTDレセプターの細胞外、細胞内及び内部ドメインの予測される配置を図示している。

特定のPTDレセプター断片の例には、R3-3Bクローニングの既定アミノ酸配列に由来する以下のアミノ酸配列(括弧の一文字記号で示されている)が含まれる。

ている:

## 細胞外ドメイン:

- RP-1: TNETREREVFDRLGHMIYTVC (SEQ ID NO. : 5)  
 RP-2: VLYSGCTTLDEAERLTSEEL (SEQ ID NO. : 6)  
 RP-3: VTFFLYFLATNYYYWILVEC (SEQ ID NO. : 7)  
 RP-4: Y-RATLANTGCWCL6SOBKEWIIQVP (SEQ ID NO. : 8)  
 RP-5: PYTEVSGTLEWQIQMHYEM (SEQ ID NO. : 9)  
 RP-6: DDVFTKESQIFLLHRAQA (SEQ ID NO. : 10)

## 細胞内ドメイン:

- RP-7: FRRLLNCTRY (SEQ ID NO. : 11)  
 RP-8: ERKYLWGFTL (SEQ ID NO. : 12)  
 RP-9: VLATKLRETNAGRCDDTQQYRKLLK (SEQ ID NO. : 13)

これらの断片はKaufmannからの方法(Eduocrinology 11: 1230, 1984)によって合成され、HPLCによって精製された。ヨリベブチドの合成

本発明によるヨリベブチドは、本発明の指標レセプターの一部または全部をコードしている配列を持つ既設アミノ酸から、なにか適切な発現系、例えば、適当な発現細胞(原核あるいは真核)の、適当な発現促進剤(例、pCDNA1)内の組換え技術による実験装置を用いて、発現することにより生成することが可能である。正規にいかなる細胞を用いるかは、本発明にとって重要ではない。しかしながら、本発明のヨリベブチドがPTD/NPTD-レセプターの全體または一部

を含む場合には、以下の宿主細胞が好適である。COS細胞、LISH-PK1細胞、OK細胞、AT-20細胞、及びCHO細胞。導入の方法及び表現装置体の選択は選ばれた寄生系に依存する。細胞質細胞の導入の方法は、例えば、Albers et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989)に記載されており。発現宿主細胞は、例えば、Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. G. Pouwels et al., 1985, 編集, 1987)に記載されているものから選んでよい。真正に導入された細胞は、レセプター-DNAを宿主細胞の染色体に組み込むことによって作ることが出来る。適当なDNAは、pCDNA、pCDNA1-Neo、あるいは他の適切なプラスミドに挿入され、次いで、細胞は、このプラスミドにより、pSV-2-Neo、あるいはpSV-2-DBF Mとの共同移入をして、あるいはしないで、電気電流があり、うん殺カクシム、及び/あるいはカゼキノ/デキストラント技術によって導入される。導入された細胞の選択は、累積的に上昇するレベルのG418 (Celtex, GIBCO)、そしてもし必要なら、ノートレキサートを印いて行われる。

本発明のヨリベブチドをコードしているDNA配列は、また、塗抹蛋白質にも発現することが出来る。細胞のレセプター、あるいはレセプター断片をコードしているDNAは、原核細胞壁における発現をもたらすことの出来る酵母グリコナラーゼ同定試験に適応されたベクター上を選ばれる。もし希望ならば、コードィング配列は、そのうち一末端に、発現された蛋白質の宿主細胞の用意断面への分泌をもたらし、それによって蛋白質の回収とその後の精製を容易にすることの出来る既知のシグナル配列を用いても構成を合むしとら出来る。最も頻繁に用いられる酵母細胞は酵母の<sup>1</sup>S. cerevisiaeの株である。しかし、他の微生物の株もまた使用してよい。プラズミドベクターは、塗抹蛋白質、細胞内蛋白質のマーク、及び蛋白質断片に適合する性質を有する利潤配列を含むものが用いられる。例えば、E. coliは、pBR322、これはBlattner et al. (Gene 2: 95, 1977)によって、3つの自然界に分立するア

タスミド、それにうち2つはS. pombeの11aの株から、1つはE. coliから分離されたものであるが、に由来する断片を用いて構成されたプラスミドであるが、その構造体を用いて既設させることが出来る。pBR322は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性座の選択子を含み、そのため、希望する表現ベクターの構造において、保持され、あるいは候補され得る多數の選択可能なマークを提供する。一般に用いられる原核細胞の利潤配列(また、“細胞因子”とも呼ばれる)は、ここでは、別途にオペレーター、サボーム結合部位配列と共に、既存細胞のためのプロモーターを含むものと定義される。蛋白質の表現を指令するため一端に用いられるプロモーターには、ラムダ-山羊のP<sub>L</sub>プロモーター及びβ-1道子リガーソーム結合部位(Simola-Lake et al., Nature 292: 128, 1981)ばかりではなく、B-テククマーゼ(ペニシリナーゼ)、テクトース(tac) (Chang et al., Nature 198: 1056, 1977)及びトリプトファン(T7)プロモーター系(Geoddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980)も含まれる。

本発明の新規化セプター蛋白質は、以下のような性質を持っているので、細胞内に発現すると、それは細胞質へ、部分的には膜を貫通して移動し、その結果、その一部は膜に埋め込まれて止まり、一部は細胞内に伸展し、一部は細胞内に止まる。このような埋め込まれた細胞セプターを持つ形質転換された細胞は、それを自身、本発明の方法の中で用いられてもよく、あるいは、セプター蛋白質は膜から抽出され、復製されることも可能である。

細胞の蛋白質を細胞膜に漏り止める責任を負う蛋白質の疎水性部分を大きくアミノ酸断片は、開発しても、膜に埋め込まれることは避けられない。これらが細胞内に止まるか、あるいは細胞外断片に分泌されるかは、細胞を構成する膜(例えば、シグナルペプチド)が含まれているか、否かによる。もし、分泌されれば、本発明のヨリベブチドは細胞から復製することが出来る。もし、そうでなければ、細胞は死体として、倒産のヨリベブチドは細胞の全内容を分解しなければならない。発現される可能性のあるヨリベブチドの特徴は、限界はないが、以下のものが含まれる。

## 特表平6-506598 (13)

3) 図3に示されるようなラットの骨のPTB/P TH/Pレセプターの、骨走りーダー配列を含む、アミノ酸1-192からなるアミノ末端部分。

2) 図3に示されるようなラットの骨のPTB/P TH/Pレセプターの、骨走りーダー配列を除外した、アミノ酸27-192からなるアミノ酸末端部分。

3) 図3に示されるようなラットの骨の完全長のPTB/P TH/Pレセプター。

4) PR-1 (上記のようないし)。

5) PR-2 (上記のようないし)。

本発明のポリペプチドは、アフィニティクロマトグラフィーを用いて容易に精製することが出来る。これらのポリペプチドの抗体、あるいはレセプター特異的リガンド(例、PTB/P TH/Pレセプターに対するキラモンP THとPTB/P TH)は、セファロース-4-CHEM-Ⅱ-活性炭セファロース(セファロース-4-CHEM-Ⅱ-活性炭セファロース)のような固相担体に充てん結合し、半発明のポリペプチドをなんらかの起始質から分離するのに用いてもよい。一般的には、10gのリガンドあるいは抗体がPTB/P THで活性化されたセファロースを40mlで17-20時間(温度下)インキュベートされる。セファロースは、1Mトリス緩衝液(pH8)で洗浄して過剰の無機酸をブロッケする。セファロース-PTB/P THセファロース-PTB/P TH、あるいはセファロース-抗体は、次いで、粗ポリペプチドと混在する蛋白質(pH7.4中、4度で2時間インキュベートされる(温度下))。セファロースは、次いで、一般的にはカラムに充填され、入念にPBSで洗浄され(一般的にはカラムの10倍)、水で透析した後(1度目、2度)で洗浄される。透析液は、次いで、透析乾燥により凍結され、その乾燥は、例えば、速冷II PRCで検査される。

#### 抗細胞レセプター抗体

本発明の細胞レセプターあるいはレセプター断片は、専門家にはよく知られているなか通常の方法によって、ポリクローナル抗体を産生する方法、及びモノクローナル抗体を産生する方法を含め、抗体を産生するのに用いることが出来る。例えば、PTB/Pレセプターの抗体アミノ酸配列は、他のG蛋白結合レセプターに見出だされる領域に参照した結果外と細胞内と想われる構造(図21を見よ)。

いは1%パワフォルムアルデヒドで固定し、蛋白質染色法で検査された(もし、PTC-標識の第二抗体が用いられた時)。

抗体を生成するもう1つの方法は、抗原として細胞(例えば、レセプターをコードしている細胞を移入されたウツラウツ細胞のような哺乳類の細胞)の表面に充てんされている本発明の装置の細胞レセプター蛋白質を利用して。このような細胞は、常法、例えば、DEAE-デキストララン注入液により、細胞レセプターの表面の発現をコードし、且つ、指令することの出来るベクターを用いて生成することが出来る。例えば、PTB/P TH/Pレセプターに特異的なモノクローナル抗体は以下の手順で生成される。

ラットの細胞えびす肝レセプターを細胞表面に高度に充てんしている表面のG蛋白をカルボマーとマウス(Charles River Laboratory)のマウスは4週ごとにPTC-標識により初期免疫を受け、最後の3日前に、外膜内(IV)筋肉免疫により終期免疫される。このマウスから脾細胞を分離し、エターナル細胞と培養により増殖する。ハイブリドーマは、標準のヒギキサンチン/アミノブチリン/チミン(GBAT)培地で常温で育てて選別される。PTB/Pレセプターを認識する抗体を分離するハイブリドーマは、最初、細胞あたりPTB/Pレセプターのコピーを元来量以上に選別する閾値(例:0.5-1/2、あるいは0.5和膜)で、適切の免疫的活性を用いてスクリーニングして確認される。PTB/Pレセプターに指令することの出来る抗体を産生するこれらのハイブリドーマは培養して、サブクローニングされる。次いでモノクローナル抗体の性質を顕著に検討するために、ラヂオレセプター及びcAMP刺激アッセイを用いる二次スクリーニングを行うことが出来る(以下参照)。

#### PTB/Pレセプター-アンタゴニスト及びアゴニストのスクリーニング

本発明のポリペプチド及び抗体ならびに他の化合物は、PTB/P TH/Pレセプターのアゴニスト的な性質について、ここに記載のアッセイを用いてスクリーニングすることが出来る。

1) 肉をあげると、豚脛の細胞上のPTB/P TH/Pレセプターを認識するこれらの抗体は、PTB/P TH/Pレセプターへの結合に対し結合

を示す記憶した既存の質膜(即ち、豚脣)ドメインを持つと思われる蛋白質結合を示している。この情報は、レセプター蛋白質の細胞外側に示している見込みがあり、荷ってIn Vitroで抗体に提示されるであろう領域の選択を手引さるために用いることが出来る。このような領域の1つ、あるいはさらによくを表現する短いペプチドを合成し(例えば、化学的に、あるいは酵母DNase活性により)、ポリクローナル、あるいはモノクローナル抗体を誘導するためには動物(例えば、ウサギ、あるいはマウス)を免疫するのに用いることが出来る。例えば、上記のPTB/P TH/Pレセプターのペプチドのあるもの(RP-1、RP-5、及びRP-6)は、蛋白の濃度を用いて化学的に合成され、以下の手順によりウサギにポリクローネル抗体を誘導するのに用いられる。

完全プロテオジンアミノ酸で乳化された既存のペプチドの標品をウサギに皮内注射する。追加免疫は、不完全あるいは完全アシニバントで、毎月間隔で実行される。

抗体活性は2つの方法のいずれかを用いて評価される。第一に、抗体を1%正常ウサギ血清で被感化後、<sup>125</sup>I-標識PTB/P TH/Pレセプター断片と反応(例えば、Segre et al., 上記)により24時間、4°Cでインキュベーションする。結合した<sup>125</sup>I-標識PTB/P TH/Pレセプター断片は、非結合のものから、100pmの第二抗体(抗ウサギIgG、S129等)を20倍で希釈したもの及びIgMの5%ボリニナレングリコールを加え、次いで、2000 rpmで30分、4°Cで心臓することによって分離される。上清を除去し、ペレットをカウンターで、放射活性の分析をする。第二の方法では、自発型の(例えば、ROS 17/2.8, 0.3, S405-2断片)あるいは粗抗体(例:OK-159, OK-0あるいはOK-1を移入されたCOS細胞あるいはCHO細胞)PTB/P TH/Pレセプターを免疫している細胞群が、標識抗体が結合した抗体と4°C、20°C、あるいは4°Cで1-4時間インキュベートされる。細胞をPBSで3回)洗浄し、<sup>125</sup>I-標識(NI-34、Durophol)あるいはFITC-標識(S129等)の第二抗体と2時間、4°Cでインキュベートする。洗浄後(PBSで3回)、細胞は0.1MNaOHで溶解してカウントで測定されるか(もし、<sup>125</sup>I-標識の第二抗体が弱いられた時)、あるいは

する能力についてスクリーニングされる。細胞表面にPTB/Pレセプターを発現している細胞は、<sup>125</sup>I-NI-PTB/P断片である<sup>125</sup>I-NI-PTB/Pあるいは<sup>125</sup>I-PTB/Pと、既存のポリクローナルあるいはモノクローナル抗体の存在下、2時間、1度でインキュベートされる。使用される抗体は、粗細胞液、粗細胞液、あるいは豚脣由来のものか、あるいは被感化された豚のものである。インキュベーション後、細胞は結合蛋白質(例えば、生理食塩水)で洗浄、溶解され、ガンワーカウンターを用いて放射活性を定量分析される。PTB/PレセプターへのPTB/P断片の結合を認める抗体は、競合的、遮蔽しないものは非競合的と分類される。

抗体及びモノクローナル抗体を含む、化合物は、それらのアゴニストあるいはアンタゴニストとしての性質につき、上記のくん麩P質膜、細胞内カルシウム、及びあるいはイノシトールリシン酸のアッセイを用いてスクリーニングすることが出来る。細胞表面上にPTB/Pレセプターを発現している細胞は、PTB/P TH/Pレセプター流体、あるいは既存名も或る由来なものと、2 mM IBMX(3-イソブチル-1-メチルキサンチン、Sigma, S1, Lovast, MO)の存在下、5-60分間、37°Cでインキュベートされる。ナイクリックAMPの濃度は、上述のように、特異的ラジオイムノアッセイによって測定される。PTB/P TH/Pレセプターへの結合に対してPTB/P TH/P結合し、且つ、PTB/P TH/Pのくん麩P質膜に対する効果を認める化合物は、競合的PTB/Pアンタゴニストと見做される。反対に、PTB/P TH/PレセプターへのPTB/Pの結合と競合しないが、なお、PTB/P TH/Pと結合能を阻害する(恐らくは、レセプター活性化部位を妨害することにより)化合物は、非競合的アンタゴニストと見做される。PTB/P TH/Pレセプターへの結合に対しPTB/Pと競合し、PTB/Pの存在あるいは非存在下にcAMPの活性を制御する化合物は競合的アゴニストである。PTB/P TH/Pレセプターへの結合に対してPTB/Pと競合しないが、PTB/Pの存在あるいは非存在下に、なお、cAMPの活性を制御する能力があるか、あるいはPTB/P单独によって観察されるよりも高い活性を示す化合物は、非競合的アゴニストと見做される。

#### 作用剤

本発明のポリペプチド、抗体、及び他の化合物は、本発明の細胞レセプターと

冀平6-506598 (14)

その特質的リガンド間の相互作用に因る事と、それが引きられるような疾患の診断、分類、予後、及び／あるいは治療に有用である。例えば、高カルシウム血症及び低カルシウム血症のいくつかの症は、PTH及びPTHrPとPTH/PTHrPレセプター（受取）との相互作用に因る事で、高カルシウム血症は、血中のカルシウムレベルに異常に上昇のある状態である；それは、しばしば、副甲状腺腫瘍や甲状腺、骨組織、乳腺、肺、及び前立腺の炎症、及び筋肉の筋膜や筋肉の筋膜炎、多発性骨髄腫、及び腎臓を含む他の病気に因る事である。低カルシウム血症は、血清カルシウムレベルが通常に低い状態であり、例えば、甲状腺機能低下症に因る事などです。この不規則から生じることがある。

別の例では、本説明の七分類は、糖尿病の発症においてられ、これらは、筋力  
シシウム血症を示すし、筋の高カルシウム状態を区別する、ひち、P THあるいは  
PTSHによって媒介される高カルシウム血症（例えば、甲状状腺機能亢  
進症及び悪性の骨腫瘍カルシウム血症）を、これらの因子をもとね説明（即  
は、特に直接は触れているが他の細胞の存在によって媒介される筋肉の付着化度、  
及び筋肉細胞活性化因子（インターロイキン）、リンホキナシン、ガルシリオ  
ール、ナイプをプロスタグランдин、及びピクミンD-種ヌスチロールのような筋  
活性因子の増大によって媒介されるいくつかの筋少型悪性腫瘍関連の高カルシウ  
ム血症）から区別するため用いられる。

本発明の他の診断的応用として、PTTあるいはPTT<sub>E</sub>Pに関連する症、例えば、心臓の状態をカルシウム血症に関連する症、を診断するため、及び、現在症の曲、PTTあるいはPTT<sub>E</sub>Pのレベルを監視するために、生物的試料そのPTTあるいはPTT<sub>E</sub>Pのレベルの測定が可燃である。この方法には、半

発明の組成を単純化するため、組成試料に導入する P T H A あるいは P T H R P への結合を、ここに記述されている結合アッセイを用いて、測定することがされている。結合のレベルは、直線測定することも出来る（例えば、放射標識をしたダイヨレシプターを用い、内在性 P T H に結合する放射能をアッセイすることによって）。代わりに、糸網（例えば、組織切片）への P T H レセプターの結合は、被膜切片を P T H おレセプターに特異的な抗原で、標的の免疫吸収法 (C l i c k e t a l . , *Hybridoma* 5: 339, 1986) を用い染色して追跡することが出来る。

第三の診断的アプローチでは、細胞系を《Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Publishers, New York, 1987》に記載されている方法により)適当なプロモーターに組み込まれたPTTHレセプター遺伝子を安定に導入することが出来る。代わりに、PTTH/PTTH-Pレセプターは、質粒のベクター、即ち pCDNA1から表現され、そして試験用HPR過剰供与者移入して、ストレミガード培養(Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 2495-2499, 1983)を通じてさらに選択子の活性を可能にすることが出来る。遺伝子のこのような高濃度の発現によって、PTTHあるいはPTTH-Pに組み込まれる不純の細胞系が生成される。このような細胞は、PTTHあるいはPTTH-Pの血清レベルを検出するための既に専用な手段を提供する。このような細胞糸は、上質したPTTHあるいはPTTH-Pレベルを有する状態(例えば、上記の状態)、あるいは、PTTHあるいはPTTH-Pの混在に低いレベルを有する状態(例えば、上記の状態)の診断に用いることが出来る。このような細胞糸は、また、高カルシウム血症あるいは低カルシウム血症の治療の間に、我々、PTTを行あるいはPTTH-Pレベルの進行あるいは治療の監視に有用である。

高カルシウム血症の多いある患者は、本加崩の化合物を用いて治療してもらいました。症状は炎症として現れることがあり、炎症しなければ致命的なこともありますので迅速な介入が重要である。1つの応用において、血清カルシウムレベルは日々あるいはPTTとPのアンゴニストを含む、既成の治療のコースで安

定化する。このほかアンケラムスチロールには、P.T.D.レセプター親介による細胞の活性化に介入することが示唆されている（ここに記述のアセチル化により）半胱氨酸の化合物が含まれる。アンケラムスチロールを殺虫するためには、適当な浓度あるいはペプチドは、一般に、生型受容体のような過当な濃度中に作用することによって殺虫剤の活性が示される。P.T.D.レセプターへのP.T.D.あるいはP.T.H.・P.の結合に対し選択性を示す殺虫の用量で、既臍内注射される（例えは、血清カルレウムレベルを $1.0 \text{ mg/g}$ より $1.5$ 以下に下げるのに十分な用量）。代表的な用量は、一日当たり、体重 $1.0 \text{ g}$ につき、既臍あるいはペプチド、 $1.5 \text{ g}$ から $1.0 \text{ mg}$ である。古記では、既臍カルシウムレベル（即ち、レベルは $0.1 \text{ mg/g}$ より $0.5$ 以下）の其の測定値のため、名前な時は反復してもよい。これは、高カルシウム血症のむづむづとなるも、尿膜にある糸状の細胞層に必要がある知らない。あるいは、それは、例えは、最初既臍のような形状の長期にわたる位置に用いてもよい。

他のむきにおいて、本発明の方法に従ってアゴニストであると假定行けばこれらが本発明の化合物は、歯科上、例えば、劇甲状腺の部分的あるいは完全な外側的またはかららごとの低カルシウム血症の治療に用いられる。アゴニストとは、通常的な固体（例えば、生乳高鈣水）中に溶解され、血清のカルシウムを許容レベル（即ち、右より 0.05 メガモル）までの上昇をもたらす効果で、出来れば前回投与されるのが望ましい。典型的用量範囲は、1 口、体重 1 kg 当たり、アゴニスト 1.0 mg から 1.0 mg である。適切な低カルシウムレベルを維持するためには量を増加し、結果を保り延びることも出来る。長期の処置は、劇甲状腺切除を実行せざるを得ないことがある。

本説明の技術もまた有効のために用いることが出来る。P.T.H.レセプターはR.N.A.（あるいはP.T.H.レセプター-R.N.A.）でシナセシスであるRNAを合成する核糖核酸（核糖核酸）にアンチセンスであるオリゴアクリオキドは、切断剝離として用いられることがある。このアプローチは、例えば、P.T.H.レセプター、P.T.H.あるいはP.T.H.R.P.の量あるいは活性を増大するケノムの同調あるいは活性から生じる高カルシウム血症に対して有用である。この方法には、ミクティリド、アンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞液に投入することが含まれている。アンチセンス脂質、内在性P.T.H.レセプター-R.N.A.とハイブリッドを形成して、生

白質の損傷を防ぎし、それによって、この様な損傷におけるアセチレーブターの生成を低下させ、PT<sub>H</sub>/PT<sub>T</sub>とF間の低能導通を抑制する。アンチセンスの設計及び蛋白質誘導への挿入方法は、例えば、下記参考文書等に示す如く、U. S.特許登録番号4,740,463に記載されており、ここでは引用して読み込まれている。本発明のO-D-1H、O-K-10及びR158PT<sub>H</sub>/PT<sub>T</sub>とPレセプターの生化学的特徴の検討は、PT<sub>H</sub>のそのレセプターとの相互作用によって引き起こされることが現在知られている2つの伝達経路は別個のものであり、分別されるかも知れないことを示している。これらレセプターの手順アミノ酸配列は、イノシトールリン酸代謝をはじめ様々な機能に活性化するようには見えないO-D-1Hは、O-K-10あるいはR158よりも70アミノ酸分長いことを示唆している。本発明の配列とここに開示されている情報を用いて、いかなる筋肉細胞からのPT<sub>H</sub>/PT<sub>T</sub>とPレセプター遺伝子にせよ、これをクローン化し、次いで改変して（例えば、面倒な実験操作により）、ホスホキナーゼCを活性化しないPT<sub>H</sub>/PT<sub>T</sub>とレセプターを実現することが可能となる。このことに、骨の再生及び骨の炎症を含め、PT<sub>H</sub>によって神介された筋肉の作用を分割する可能性を示すものであり、骨粗鬆症のような骨の疾患の治療に対して大きな希望性を有する。

P T D レセプターをコードしている本発明の技術は、また、選択された部位で実験的プロテオキナーゼ及び／又はエンハンサーに導導し、その結果生じたハイブリッド遺伝子を、常法により（例えば、L e g e r e t al. , U. S. 6, 679, 736, 737, 738 号に記述され、ここには参考して読み込まれているようだ）、初期の分化段階にある動物の胚（例えば、受精した牛ゼリ状）に導入して、形質転換した動物を作り出し、選択した標的（例えば、骨のオステオカルシンアロモーター）に P T D レセプターを高レベルで発現することを図る。この場合はアロモーターは、形質転換動物における P T D レセプターの組合せ的発現を防ぐを目的るために用いられる。利用される P T D レセプターの型は、用いられる細胞や組織のものに依頼の P T D レセプターをコードしている形、あるいは、それは、別途の P T D レセプター既存体をコードすることも出来る。1つの行動において、形質転換されたヒトトリがヒトニクトリの細胞質を高レベルの発現を指令するアロモーター

## 特表平6-506598 (15)

ターからP T Xレセプターを発現するように工作された。このような動物は、高いカルシウム含量と、述べてより固い歯を持つ牙を歯むことが期待される。

## 歯の発達過程

他の発達過程は、以下の特許請求の範囲内にある。例えば、本発明の披露には、トリ、あるいは仔豚類、げっ歎類、または人類のような哺乳類を含むいかなる研究動物種にせよ、これらから本来分離された遺伝子、あるいはc DNAあるいはRNAを包含する。オボッサム、ラット、及びヒトのような多様な動物種からのP TXレセプターに対して証明された適度の相間性は、ここに開示されたP TXレセプターの分離方法が、多様な動物種からの調査した初期レセプターの分別に広く利用されることを示唆している。

## DNA及びアミノ酸配列のコンピュータ記述

## (1) 一般情報

(i) 申請者 Segre, Gino V.  
Kornnenberg, Henry M.  
Abou-Samra, Abdallah-Badi  
Juppner, Harald  
Polter, John T., Jr.  
Schneider, Ermentrout  
(ii) 発明の名義: 制限状態キルセンレセプター及びこれをコードしているDNA

## (iii) 特別の號: 3

## (iv) 送信代理

(A) 受信者 Fish & Richardson  
(B) 通り 225 Franklin Street  
(C) 市 Boston  
(D) 州 Massachusetts  
(E) 国 U. S. A.  
(F) 郵便番号 02110-2804

## (v) コンピュータの試算可能型

(A) 構体タイプ: 3, 5" ディスクケット、3, 44メガバイト記憶容量  
(B) コンピュータ: IBM PC/2 モデル 50Zあるいは5SX  
(C) 作動系: IBM PC, DOS (バージョン3.30)  
(D) ソフトウェア: ワードペーパーフロント (バージョン 5.0)

## (vi) 資料の中継データ:

(A) 申請番号:

(B) 提出日時:

(C) 分類:

## (vii) 以前の中継データ:

(A) 申請番号: 07/681,702

## (2) 特別著録番号: 1に対する情報。

## (i) 特別の特徴:

(A) 長さ: 1862

(B) タイプ: 株脚

(C) 種の状態: 2系統

(D) トポロジー: 線状

## (ii) 特別の記述: SEQUENCE ID NO: 3:

GGGGGGGGG CCCCCCCCCC GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG 60  
GGGGGGGGG CCCCCCCCCC GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG 120  
Arg Gly Ala Pro Arg Lys 6  
10  
15  
20

Arg CTC AGG CTT CGG TGG CTC CTC TGC TCC TCG AGG TCG TCC GTC 180  
Ser His Ser Leu Ala Ile Ile Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val 240  
25  
30

TAC CCA CTC CGG GCG TGC CAT CTC GTC ATA AGG AGG CTC GAG CTC 210  
Tyr Ala Leu Val Arg Ala Asp Val Ile The Lys Glu Glu Glu Ile 270  
28  
33

ATG CTC CTC CGG AGG CTC CTC TGT CTC CTC CGG CGG CTC AAA ATG 290  
Ser Leu Leu Arg Ser Leu Glu Glu Glu Glu Arg Lys Lys Glu 350  
36  
40

GCG GTC AGG CGG CGT GAA GCT CCT GAA TGT GAG AAC TGG TGG TGA 320  
Val Leu Arg Val Pro Cys Leu Arg Ser Leu Tyr Asp Thr Met Ser 380  
39  
45

AGG TCT CGA AAC AGG AAC CGG AAC CGT AAC GAA AAC CTT TTA CGG 350  
Arg Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Ser Tyr Glu Ser Glu Tyr Lys Pro 410  
42  
46

CAG GCG GAG TAC AGG CGA CTC TCT GAG AGG AGG CGG CGT CGG GAG 400  
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Arg Glu Ser Arg Lys Cys Arg 460  
47  
50

GCG TCG TGG CGA CGG 430  
Ala Phe Cys Ile Pro Glu Thr Asp Arg Ile Val Cys Thr Pro Ala Glu 520  
53  
58

ATG CGG CGG AGG CTC CGG 460  
Val Pro Glu Lys Val Val Ser Cys Pro Asp Cys Thr Pro Tyr Asp 580  
59  
63

TTC AAC 490  
Ser Arg Ala Ser 640  
65  
69

特表平6-506598 (16)

TTC GAC CTC CGC CCT CGG AAC AAC CGG AGA TCG CGG KAT TAC AGG GAA TSP Lys Ile Val Phe Tyr Ala Asn Asp Thr Tsp Asp Asn Tyr Ser Asn 155	160	165
CCT GTC CGG AGG AAC TAC AGT GTC GGC GAG TCC AAT TGT CTC GGC CCT CTC Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Asp Ile Tyr Ser Asp Leu Gly Ser 185	190	195
CCT AAT GTC GCT GTC CGC ATG CGG CCT TAC TCC AGG AGG DGA TTA CAG TCC Lys Thr Val Asp Val Lys Lys Lys Cys Tyr Ser Asp Arg Leu His Tyr 200	205	210
ACC CCA AAC TAC AGT CAC ATG CTC GTC CCT TCG TCC TTT AAC CTC CGG Tyr Asp Ser Tyr Ile Asp His His Leu Phe Val Ser Glu His Lys Asp 215	220	225
GCT GTC AGC ATC TCC ATG AAC GAT GCT GTC CTC TAG TCA CGG CCT TCC Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Arg Ala Val Lys Ser Glu Val Ser 235	240	245
ACA GAT GAA AAC TAC CGG CGC ATG AGC AAC GAG CGG AAT GGC GTC ACT Thr Asp Glu Ile Asp ATG Lys Asn Glu Glu Ser Asp Asp Pro Thr 255	260	265
CAG CCT CGC CCT GCT GAC CAC KAG CCT CCT CCT GTC AGC GGC GTC ACT Glu Pro Pro Pro Asp Arg Lys Ala Glu Lys Val Glu Asp Val Asp 275	280	285
GCA ACC GTC TTC CCT GAT TAC AAC CGC CCT CCT CCT CCT CCT CCT Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asp Thr Tsp Asp Ile Lys 295	300	305
GTC GAA GGC UTC TAC CGG CCT CGC AAC TAC ATC TCC AGC CCT CCT CCT Val Glu Glu Lys Lys Tyr Phe Ser Lys Tyr Lys Ser Asp Phe Thr Ser 325	330	335
GTC AAA KAG TAT GTC TGC CCT CCT CCT GTC AGC AAC AAC CCT CCT CCT Cys Lys Lys Tyr Lys Tyr Phe Glu Phe Ser Lys Ser Glu Val Lys Phe 355	360	365
GCC CGG TTT GTC CCT CCT GTC CGG AGC CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT Asp Val Phe Val Ala Val Val Val Val Val Asp Asp Asp Asp Asp Asp 385	390	395
AGT GAG TGC TGG TCC GTC CGG AGT TCC ACA TTA CCT CCT CCT CCT CCT CCT Thr Glu Cys Tyr Arg Lys Ser Glu Lys Lys Lys Tyr Thr Lys Lys Glu 425	430	435

GTC CGC ATC CTC GCA GCT MTC GTC GCG AGC PTC AGG CGT TTT ATC ATG  
 Val Leu Lys Ala Asp Ile Uaa Utc Uuu Phe Tyr Lys Pro Ile Asp  
 362 363 370  
  
 ATA ATC ACA CTC CTG GCT AGT ATC AAA CTC CGG GAA PCC ATAT CGA CGG KAA  
 Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Eye Leu Arg Tyr Val Thr Phe Ala Gln Arg  
 371 380 389  
  
 TGT CAC AGG AGG GAA CGG TAT ATG AAC TGC CTC ATG AGG TGC CTC GTC  
 Cys Arg Thr Arg Gln Cys Tyr Arg Eye Leu Lys Ser Thr Leu Val  
 398 400 402  
  
 CTC ATG AGC CTC TTT GCG CTC CGG TAC ATG CTC TTC ATG AGC AGG CGG  
 Leu Met Pro Leu Pro Cys Val His Asp Val Val Phe Met His Lys Pro  
 410 415 420  
  
 TAC ACA GCA GAA TCA CGG ATT CTC TGC CGA CGC GAA ATG CGG ATAT GAA  
 Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Tsp Gln Val Ser Met His Tyr Glu  
 425 430 435  
  
 ATG CTC TTC AAC ATG TCA CGG CGA TTT TCC GCT AGT GCG AGG ATC ATG TGT  
 Met Leu Pro Asp Ser Thr Cys Gln Gln Phe Ser Val Ala Ile Ile Tyr Cys  
 440 445 450  
  
 TTT TCG RAA CGA GAG CTC CGA CGG CGC AGC AAC TCA TGG AGG CGA  
 Pro Cys Arg Gly Ile Val Val Ala Asp Gln Eye Lys Ser Tsp Ser Arg  
 455 460 470  
  
 TCC AGG CTC GGC TCA CGC TCC AAC CGG AAC GCG CGG AGG PTC CGG AGC AGC  
 Ser Thr Leu Ala Ile Ser Arg Eye Leu Arg Ala Asp Ser Glu Ser Ser  
 475 480 490  
  
 AGU TAC AGC TAT GGC CGC ATG CTC TCA GAT AGA ACT GTC AGG AAC AGC  
 Tyr Ser Thr Cys Arg Pro Met Val Ser Met His Ser Val Thr Met Val  
 495 500 505  
  
 GCA GCT GSA GGA CGG CGG CGG CGC CTC CGC GTC GRC TAGGCTGCG  
 Gly Pro Arg Gly Gly Ile CGG Pro Cys Pro Ser Ala Lys Arg  
 510 515 518

```

GGCTGAGGAC AGCGGGAAPG CCGATGCGCA CTTCGCGAC TGTGCGACG AGCGTGCAG 1712
TTCGAGACG TCAATGCCCT GAGCTTGCGC AGCGCGCGC AGCGAGATG AGCGTGTCTG 1773
CAATGCGTT GCGATTTTG AGCGATGATG TGGGGPAGAG CGCGTGCAC TGGTGGCGA 1842
GAGCGAGGAG AGCGATGATG AGCGATGATG 1862

```

(2) 成列塔過橋り。2 に歸する總觀：

### （二）記述の特徴・

(A) 五三： 1863

(8) タイプ： 筋膜

(C) 級の状態: 1本筋

(D) ハガロジー： 錦狀

(x i) 配列の記述: SEQUENCE .ID NC: 2:

TCG AAC CAC AAA CGG GCA GCG TAT CGG CGG TAT GAC AGC AGG AGT CGG AGC TGC AGA AGG GTC GAA GTC AGC AGG AGC AGG AGC AGG AGC AGG AGC AGG AGC 125	146	165	186
TCC TAC CTC CTC CCT CGG CGG AGC AGC TGT GAC GAA TGA TGA 133	140	158	163
TCT GTC AGG ATG TTT CTC AGG AGG AAC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAA Val Arg Pro Leu Thr Arg Glu Arg Glu Val Pro Phe Arg 170	175	180	183
CGG CGG CGA AAC AGG TAC CGG AGG CGG CGC TAC TGC AGG TCT CTC CGG CGG CGC Arg Leu Gln Asp Ile Tyr Val Glu Tyr Ser Ile Leu Leu Leu Ser 183	190	195	198
CTC ACT GTC GCG GTC GTC AGT CTC GCG GCG TAC TGT AGG AGG GTC CGT CGC Leu Thr Val Leu Thr Leu Leu Leu Gln Tyr Phe Arg Arg Leu Leu Ile Arg 200	205	210	213
AGC CGA AGC TAC PTT CGC AGC CGT CGC TTC GTC GTC GCG TGG AGG AGC CGT CGG Tyr Arg Alan Tyr Ile Met His Leu Phe Val Ser Ser Ser Ser Leu Arg 213	220	225	230
GCT GTC AGC AGC TAC ATC AAC AAC CCT GTC GTC GTC AAC TAC TCG CGG CGT TCC Ala Val Ser Ser Ile Phe Val Asp Ala Val Ile Tyr Ser Glu Gln Val Ser 235	240	245	250
ACA GAT GAA ATC GAG CGG ATG AGC AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG The Asp Glu Lys The Glu Glu 260	153	155	158
GAG GTC CGC CCT CGG CGC AAC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG Dle Pro Pro Pro Pro His Arg Lys Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu 265	270	275	280
GTA AGC GTC TTC CGT TAC TGT CGT ACC ACC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC Val Thr Val Val Leu Tyr Lys Val Thr The Asn Tyr Tyr Pro Val Leu 285	290	295	300
GTC GAA GAC CGC GAG CTG CGC AGC GTC ATC TTC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC Val Glu Val Leu Tyr Ser His Ser Leu Ile Phe Arg Ala Phe Phe Ser 295	300	305	310
CGC AAA AAC TAT GTC TAC CGT AAC GTC TTA TGT CGG CGG CGC CGC CGC CGC CGC CGC Gln Lys Lys Tyr Leu Pro Val Gln Phe The Leu Pro Glu Tyr Glu Lys Ala Arg 315	320	325	330
GCG GTG TTT GTC CGT GTC TGG CGC AGC GTC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC Ala Val Phe Val Ala Val Tyr Val Val Val Arg Ala Ile Leu Ala Arg 349	355	360	365

## 特表平6-506598 (17)

ATC GAC TGC TGC GAC CTC AGT TCC GCG AAT AAC CGG ATC ATC GAC TCC GAC GTC TGC TGC GAC CTC AGT TCC GCG AAT AAC CGG ATC ATC 345 350 355	1191
GTC CCC AGT CTC GCA CCT ATC GTC CTC AGC TGT TTT ATT CCT TTT ATT CCT Val Pro Ile Val Alu Ala Ile Val Val Asp Phe Ile Leu Pro Ile Leu 360 365 370	1219
ATC ATC AGA CTC CTC CCT ACT AAC GTC CTC AGC AGT AAC GTC AGA TTC Ile Asp Val Leu Ala Ile Val Val Asp Phe Ile Leu Pro Ile Leu 375 380 385 390	1267
TGT GAC AGG AGG GAA CAA CAC TAC AGA AAC GTC CCT AGC AGT AAC GTC AGA Cys Asp Thr Asp Asp Glu Tyr Asp Tyr Leu Leu Lys Asp Thr Ile Val 395 400 405	1315
CTC ATG CGG CGG TTT CGG CGG CGG TAC TGC TGC TGC TGC CGG CGG CGG Leu Met Pro Leu Pro Glu Val His Tyr Ile Val Val Phe Met Asp Thr Pro 410 415 420	1363
TTC AGC GAA GAA TCA CGG CCT CCT TCC GAA CGG AGC TAC TAC TAC Tyr Thr Glu Val Ser Glu Ile Leu Tep Glu Val Glu Asp His Tyr Glu 425 430 435	1413
ATG CGC TGC AGT TCA TGC CGC CGA CCT CCT CGG CGG AGC AGT AAC TAC TAC Met Leu Pro Ser Glu Val Asp Phe Val Asp Ile Tyr Cys 440 445 450	1450
TTC TCC ATC GAA GAA UTR GAA GCA GAG ATC AGC TAC TAC TAC AGC CGA Tic Asp His Glu Val Glu Glu Ile Glu Tyr Lys Asp Thr Asp Asp Asp 455 460 465 470	1507
TGG AGC CGT CCT CCT Tyr Thr Leu Ile Asp Val Asp Val Asp Val Asp Val Asp Val Asp Val 475 480 485	1555
AGC TAC TGC TAC CCT CGC AGC CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT Tic Tyr Ser Tyr Glu Pro Ser Val Ser His Cys Ser Val Asp Val Val 490 495 500	1603
GCA GCT CGG CGG Gly Pro Arg Glu Glu 505 510 515	1651
CGG CGT CGG CGG Gly Glu Arg Glu Glu 520 525 530	1699
AGC AGT CGT TGC AGT CCT CGC TGC CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT Gly Pro Val Val 535 540 545	1747
CTG CCT GAG TGG GAC AAC AGC GTC TCC AGT AAC CGG TCC CCT CCT CCT Leu Leu Leu 550 555 560	1785
GAA GTC GTC Gly Pro Val Val 565 570 575	1823
ATC ATC Ile Ile Ile 580 585 590	1861
ATC ATC Ile Ile Ile 595 600 605	1909
ATC ATC Ile Ile Ile 610 615 620	1947
ATC ATC Ile Ile Ile 625 630 635	1985
ATC ATC Ile Ile Ile 640 645 650	2023
ATC ATC Ile Ile Ile 655 660 665	2061
ATC ATC Ile Ile Ile 670 675 680	2099
ATC ATC Ile Ile Ile 685 690 695	2137
ATC ATC Ile Ile Ile 700 705 710	2175
ATC ATC Ile Ile Ile 715 720 725	2213
ATC ATC Ile Ile Ile 730 735 740	2251
ATC ATC Ile Ile Ile 745 750 755	2289
ATC ATC Ile Ile Ile 760 765 770	2327
ATC ATC Ile Ile Ile 775 780 785	2365
ATC ATC Ile Ile Ile 790 795 800	2403
ATC ATC Ile Ile Ile 805 810 815	2441
ATC ATC Ile Ile Ile 820 825 830	2479
ATC ATC Ile Ile Ile 835 840 845	2517
ATC ATC Ile Ile Ile 850 855 860	2555
ATC ATC Ile Ile Ile 865 870 875	2593
ATC ATC Ile Ile Ile 880 885 890	2631
ATC ATC Ile Ile Ile 895 900 905	2669
ATC ATC Ile Ile Ile 910 915 920	2707
ATC ATC Ile Ile Ile 925 930 935	2745
ATC ATC Ile Ile Ile 940 945 950	2783
ATC ATC Ile Ile Ile 955 960 965	2821
ATC ATC Ile Ile Ile 970 975 980	2859
ATC ATC Ile Ile Ile 985 990 995	2897
ATC ATC Ile Ile Ile 1000 1005 1010	2935

特表平6-506598 (18)

РОДАРГАСТ СЕКУЛЯРНО СОСИЧИЧИЧЕ ОБОГАЩЕННОЕ ЗАПАСЫ РУССКОГО 1945  
БАКАЛАВРА БАСКАЛЯРНО ОБРАЗОВАННОЕ БАСКАЛАРНО ОБУЧЕНИЕ 2005  
АМБИТАРНА СПЕЦИАЛЬНОСТЬЮ БАСКАЛАРНО ОБУЧЕНИЕ 2015

施設されているもの以下の通りである：

112.

CCT TTC GCA ATG ATC TAG ACT GTC CGC TAC TCC ATC ATG TGT CTC CCC TCC  
 Arg Thr Lys Cys Ser Ile Tyr The Val Glu Ser Ile Leu Cys Ser  
 196 197 198 199 199 200 201 202 203  
  
 GTC ACT GTC GCG CTC GTC ATC CGT CCT TCC TAT ACC AGG TTA CAT TGC  
 Leu Val The Val His Val Leu Ile Glu Tyr The Arg Leu Lys Cys  
 204 205 206 207 208 209 210 211 212  
  
 ACC GCA AAC TAC TGT GAT ATG CAT CTC TCC CGT TCC TTT ATT GTC CGG  
 The Asn Asp Tyr Ile His Met His Leu The Val Ser The Met Leu Arg  
 213 214 215 216 217 218 219 220 221  
  
 GCT CTA AGC ATG TTC ATC Ileu JAT ATT GTC CGC TAC TGT CGG CTT TCC  
 Val Val Ser Ile Glu Ile Asp Ile Val Tyr Ser Glu Val Ser  
 222 223 224 225 226 227 228 229 230  
  
 ACA GAT GAA ATC GAG CGG ATC ATC TAC GAG CAG CGC AGG CGG TCC TGA  
 The Asp Glu Ile Glu Ile Asp Ile Glu Ile Glu Leu Lys Arg Ile Phe Ile  
 231 232 233 234 235 236 237 238 239  
  
 GAG CCT CGC CCT GCT CGC CGC AGG CGG GAT TTT GTC CGG TCC AGA GTC CGG  
 Glu Pro Pro Pro Ile Asp Ile Glu Ile Glu Val Glu Cys Arg Val Ala  
 240 241 242 243 244 245 246 247 248  
  
 GTC ACC GTC CCT CCT TAC TGT CGT ACC AAC TAC TAC TAC TCC AGC GTC  
 Val Glu Val Phe Leu Tyr The Leu Thr Ile Tyr Tyr Tyr Ile Leu  
 249 250 251 252 253 254 255 256 257  
  
 CGC GAA AAC TAT GTC CGC CGC CGG TGT TAT TTT CGG TCC CGC CGC CGT  
 Glu Asn Asp Tyr GTC CGC CGC CGG TGT TAT TTT CGG TCC CGC CGC CGT  
 258 259 260 261 262 263 264 265 266  
  
 AGG UGG  
 UGA  
 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281  
  
 ACT GAG TGC TGG GTC CGG ATC ATT TGT TGT AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC  
 The Glu Cys UGA  
 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295  
  
 GTC CGC ATC GTC GCA GCT ATT GTC ATT AAC GTC ATT ATT GTC ATT AAC AAC  
 Val Phe Ile Val Leu Ala Ala Ala Val Val Val Val Val Val Val Val Val  
 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309  
  
 ATA AAT AGA GTC CGG GCT ACT AAC UAA TGT CGG CGS AGG AAC GCA CGG AGC  
 Ile Ile Asp Lys Val Lys  
 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323

F16. 1			
5 AGA AAC CTC CTG AAC TCC ACG CTA GTC			1415
6 ARG Lys Leu Lys Ser Thr Leu Val			
190	402		
5 CAC TAC ATC CTC TCC ATC GCG Acc COG			1416
6 His Tyr Ile Pro Arg Met Ala Thr Pro			
190	400		
5 CCT TGG CAA CTC GLA ARG GAG TAT GAA			1417
6 Leu Trp Gln Val Glu Met His Tyr Glu			
190	400		
5 GGA TTT CTC GTP GCC ATC ATG TAG TGT			1418
6 Gln Leu Phe Val Ile Ile Ile Tyr Tyr Gys			
190	400		
5 GCA GAG ATC IAG AAC TCA TGG AGT CGA			1419
6 Ala Glu Asp Ile Lys Lys Gln Tyr Ser Arg			
190	400		
5 AGG TGC AAC GGC CGG ATC GGT AGG ACC AGT			1420
6 Ser Tyr Asp Gln Arg Ser Gln Ser Ser Ser			
190	400		
5 GTC TCA CAA AGA AGT GTC ACG AAC GTC			1421
6 Val Ser Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Val			
190	400		
5 TGT CCG TCA GCA AGA AGT GTC ACG AAC GTC			1422
6 Cys Ser Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Val			
190	400		
5 TGT CCG TCA GCA AGA AGT GTC AAC TAC GCT			1423
6 Cys Ser Ser Ser Ser Ser Val Asp Glu			
190	400		
5 TGT CCG TCA GCA AGA AGT GTC AAC TAC GCT			1424
6 Cys Ser Ser Ser Ser Ser Val Asp Glu			
190	400		
5 TGT CCG TCA GCA AGA AGT GTC AAC TAC GCT			1425
6 Cys Ser Ser Ser Ser Ser Val Asp Glu			
190	400		
5 TGT CCG TCA GCA AGA AGT GTC AAC TAC GCT			1426
6 Cys Ser Ser Ser Ser Ser Val Asp Glu			
190	400		
5 TGT CCG TCA GCA AGA AGT GTC AAC TAC GCT			1427
6 Cys Ser Ser Ser Ser Ser Val Asp Glu			
190	400		
5 TGT CCG TCA GCA AGA AGT GTC AAC TAC GCT			1428
6 Cys Ser Ser Ser Ser Ser Val Asp Glu			
190	400		

特表平6-506598 (19)

FIG. 1

SAGE

FIG. 3

## 第 6-506598 (20)

FIG. 3

FIG. 3

GCT GTC CTC ATC CTG GCG TAT TTT AGC CGG CTC TCC AGG CGG AAC  
AAG Val Ile Ile Leu Asp Tyr Pro Arg Arg Leu Lys Cys Thr Arg Asp  
113 120 126 133 140 147 154 161 168 175 182 189 196 203 210 217 224 231 238 245 252 259 266 273 280 287 294 297 304 311 318 325 332 339 346 353 360 367 374 381 388 395 398 405 412 419 426 433 440 447 454 461 468 475 482 489 496 503 510 517 524 531 538 545 552 559 566 573 580 587 594 597 604 611 618 625 632 639 646 653 660 667 674 681 688 695 698 705 712 719 726 733 740 747 754 761 768 775 782 789 796 799 806 813 820 827 834 841 848 855 862 869 876 883 890 897 904 911 918 925 932 939 946 953 960 967 974 981 988 995 1002 1009 1016 1023 1030 1037 1044 1051 1058 1065 1072 1079 1086 1093 1096 1103 1110 1117 1124 1131 1138 1145 1152 1159 1166 1173 1180 1187 1194 1201 1208 1215 1222 1229 1236 1243 1250 1257 1264 1271 1278 1285 1292 1299 1306 1313 1320 1327 1334 1341 1348 1355 1362 1369 1376 1383 1390 1397 1404 1411 1418 1425 1432 1439 1446 1453 1460 1467 1474 1481 1488 1495 1502 1509 1516 1523 1530 1537 1544 1551 1558 1565 1572 1579 1586 1593 1600 1607 1614 1621 1628 1635 1642 1649 1656 1663 1670 1677 1684 1691 1698 1705 1712 1719 1726 1733 1740 1747 1754 1761 1768 1775 1782 1789 1796 1803 1810 1817 1824 1831 1838 1845 1852 1859 1866 1873 1880 1887 1894 1901 1908 1915 1922 1929 1936 1943 1950 1957 1964 1971 1978 1985 1992 1999 2006 2013 2020 2027 2034 2041 2048 2055 2062 2069 2076 2083 2090 2097 2104 2111 2118 2125 2132 2139 2146 2153 2160 2167 2174 2181 2188 2195 2202 2209 2216 2223 2230 2237 2244 2251 2258 2265 2272 2279 2286 2293 2296 2303 2310 2317 2324 2331 2338 2345 2352 2359 2366 2373 2380 2387 2394 2397 2404 2411 2418 2425 2432 2439 2446 2453 2460 2467 2474 2481 2488 2495 2498 2501 2504 2507 2510 2513 2516 2519 2522 2525 2528 2531 2534 2537 2540 2543 2546 2549 2552 2555 2558 2561 2564 2567 2570 2573 2576 2579 2582 2585 2588 2591 2594 2597 2600 2603 2606 2609 2612 2615 2618 2621 2624 2627 2630 2633 2636 2639 2642 2645 2648 2651 2654 2657 2660 2663 2666 2669 2672 2675 2678 2681 2684 2687 2690 2693 2696 2699 2702 2705 2708 2711 2714 2717 2720 2723 2726 2729 2732 2735 2738 2741 2744 2747 2750 2753 2756 2759 2762 2765 2768 2771 2774 2777 2780 2783 2786 2789 2792 2795 2798 2801 2804 2807 2810 2813 2816 2819 2822 2825 2828 2831 2834 2837 2840 2843 2846 2849 2852 2855 2858 2861 2864 2867 2870 2873 2876 2879 2882 2885 2888 2891 2894 2897 2900 2903 2906 2909 2912 2915 2918 2921 2924 2927 2930 2933 2936 2939 2942 2945 2948 2951 2954 2957 2960 2963 2966 2969 2972 2975 2978 2981 2984 2987 2990 2993 2996 2999 3002 3005 3008 3011 3014 3017 3020 3023 3026 3029 3032 3035 3038 3041 3044 3047 3050 3053 3056 3059 3062 3065 3068 3071 3074 3077 3080 3083 3086 3089 3092 3095 3098 3101 3104 3107 3110 3113 3116 3119 3122 3125 3128 3131 3134 3137 3140 3143 3146 3149 3152 3155 3158 3161 3164 3167 3170 3173 3176 3179 3182 3185 3188 3191 3194 3197 3200 3203 3206 3209 3212 3215 3218 3221 3224 3227 3230 3233 3236 3239 3242 3245 3248 3251 3254 3257 3260 3263 3266 3269 3272 3275 3278 3281 3284 3287 3290 3293 3296 3299 3302 3305 3308 3311 3314 3317 3320 3323 3326 3329 3332 3335 3338 3341 3344 3347 3350 3353 3356 3359 3362 3365 3368 3371 3374 3377 3380 3383 3386 3389 3392 3395 3398 3401 3404 3407 3410 3413 3416 3419 3422 3425 3428 3431 3434 3437 3440 3443 3446 3449 3452 3455 3458 3461 3464 3467 3470 3473 3476 3479 3482 3485 3488 3491 3494 3497 3500 3503 3506 3509 3512 3515 3518 3521 3524 3527 3530 3533 3536 3539 3542 3545 3548 3551 3554 3557 3560 3563 3566 3569 3572 3575 3578 3581 3584 3587 3590 3593 3596 3599 3602 3605 3608 3611 3614 3617 3620 3623 3626 3629 3632 3635 3638 3641 3644 3647 3650 3653 3656 3659 3662 3665 3668 3671 3674 3677 3680 3683 3686 3689 3692 3695 3698 3701 3704 3707 3710 3713 3716 3719 3722 3725 3728 3731 3734 3737 3740 3743 3746 3749 3752 3755 3758 3761 3764 3767 3770 3773 3776 3779 3782 3785 3788 3791 3794 3797 3800 3803 3806 3809 3812 3815 3818 3821 3824 3827 3830 3833 3836 3839 3842 3845 3848 3851 3854 3857 3860 3863 3866 3869 3872 3875 3878 3881 3884 3887 3890 3893 3896 3899 3902 3905 3908 3911 3914 3917 3920 3923 3926 3929 3932 3935 3938 3941 3944 3947 3950 3953 3956 3959 3962 3965 3968 3971 3974 3977 3980 3983 3986 3989 3992 3995 3998 4001 4004 4007 4010 4013 4016 4019 4022 4025 4028 4031 4034 4037 4040 4043 4046 4049 4052 4055 4058 4061 4064 4067 4070 4073 4076 4079 4082 4085 4088 4091 4094 4097 4100 4103 4106 4109 4112 4115 4118 4121 4124 4127 4130 4133 4136 4139 4142 4145 4148 4151 4154 4157 4160 4163 4166 4169 4172 4175 4178 4181 4184 4187 4190 4193 4196 4199 4202 4205 4208 4211 4214 4217 4220 4223 4226 4229 4232 4235 4238 4241 4244 4247 4250 4253 4256 4259 4262 4265 4268 4271 4274 4277 4280 4283 4286 4289 4292 4295 4298 4301 4304 4307 4310 4313 4316 4319 4322 4325 4328 4331 4334 4337 4340 4343 4346 4349 4352 4355 4358 4361 4364 4367 4370 4373 4376 4379 4382 4385 4388 4391 4394 4397 4400 4403 4406 4409 4412 4415 4418 4421 4424 4427 4430 4433 4436 4439 4442 4445 4448 4451 4454 4457 4460 4463 4466 4469 4472 4475 4478 4481 4484 4487 4490 4493 4496 4499 4502 4505 4508 4511 4514 4517 4520 4523 4526 4529 4532 4535 4538 4541 4544 4547 4550 4553 4556 4559 4562 4565 4568 4571 4574 4577 4580 4583 4586 4589 4592 4595 4598 4601 4604 4607 4610 4613 4616 4619 4622 4625 4628 4631 4634 4637 4640 4643 4646 4649 4652 4655 4658 4661 4664 4667 4670 4673 4676 4679 4682 4685 4688 4691 4694 4697 4700 4703 4706 4709 4712 4715 4718 4721 4724 4727 4730 4733 4736 4739 4742 4745 4748 4751 4754 4757 4760 4763 4766 4769 4772 4775 4778 4781 4784 4787 4790 4793 4796 4799 4802 4805 4808 4811 4814 4817 4820 4823 4826 4829 4832 4835 4838 4841 4844 4847 4850 4853 4856 4859 4862 4865 4868 4871 4874 4877 4880 4883 4886 4889 4892 4895 4898 4901 4904 4907 4910 4913 4916 4919 4922 4925 4928 4931 4934 4937 4940 4943 4946 4949 4952 4955 4958 4961 4964 4967 4970 4973 4976 4979 4982 4985 4988 4991 4994 4997 5000 5003 5006 5009 5012 5015 5018 5021 5024 5027 5030 5033 5036 5039 5042 5045 5048 5051 5054 5057 5060 5063 5066 5069 5072 5075 5078 5081 5084 5087 5090 5093 5096 5099 5102 5105 5108 5111 5114 5117 5120 5123 5126 5129 5132 5135 5138 5141 5144 5147 5150 5153 5156 5159 5162 5165 5168 5171 5174 5177 5180 5183 5186 5189 5192 5195 5198 5201 5204 5207 5210 5213 5216 5219 5222 5225 5228 5231 5234 5237 5240 5243 5246 5249 5252 5255 5258 5261 5264 5267 5270 5273 5276 5279 5282 5285 5288 5291 5294 5297 5299 5302 5305 5308 5311 5314 5317 5320 5323 5326 5329 5332 5335 5338 5341 5344 5347 5350 5353 5356 5359 5362 5365 5368 5371 5374 5377 5380 5383 5386 5389 5392 5395 5398 5401 5404 5407 5410 5413 5416 5419 5422 5425 5428 5431 5434 5437 5440 5443 5446 5449 5452 5455 5458 5461 5464 5467 5470 5473 5476 5479 5482 5485 5488 5491 5494 5497 5499 5502 5505 5508 5511 5514 5517 5520 5523 5526 5529 5532 5535 5538 5541 5544 5547 5550 5553 5556 5559 5562 5565 5568 5571 5574 5577 5580 5583 5586 5589 5592 5595 5598 5601 5604 5607 5610 5613 5616 5619 5622 5625 5628 5631 5634 5637 5640 5643 5646 5649 5652 5655 5658 5661 5664 5667 5670 5673 5676 5679 5682 5685 5688 5691 5694 5697 5699 5702 5705 5708 5711 5714 5717 5720 5723 5726 5729 5732 5735 5738 5741 5744 5747 5750 5753 5756 5759 5762 5765 5768 5771 5774 5777 5780 5783 5786 5789 5792 5795 5798 5801 5804 5807 5810 5813 5816 5819 5822 5825 5828 5831 5834 5837 5840 5843 5846 5849 5852 5855 5858 5861 5864 5867 5870 5873 5876 5879 5882 5885 5888 5891 5894 5897 5899 5902 5905 5908 5911 5914 5917 5920 5923 5926 5929 5932 5935 5938 5941 5944 5947 5950 5953 5956 5959 5962 5965 5968 5971 5974 5977 5980 5983 5986 5989 5992 5995 5998 6001 6004 6007 6010 6013 6016 6019 6022 6025 6028 6031 6034 6037 6040 6043 6046 6049 6052 6055 6058 6061 6064 6067 6070 6073 6076 6079 6082 6085 6088 6091 6094 6097 6099 6102 6105 6108 6111 6114 6117 6120 6123 6126 6129 6132 6135 6138 6141 6144 6147 6150 6153 6156 6159 6162 6165 6168 6171 6174 6177 6180 6183 6186 6189 6192 6195 6198 6201 6204 6207 6210 6213 6216 6219 6222 6225 6228 6231 6234 6237 6240 6243 6246 6249 6252 6255 6258 6261 6264 6267 6270 6273 6276 6279 6282 6285 6288 6291 6294 6297 6299 6302 6305 6308 6311 6314 6317 6320 6323 6326 6329 6332 6335 6338 6341 6344 6347 6350 6353 6356 6359 6362 6365 6368 6371 6374 6377 6380 6383 6386 6389 6392 6395 6398 6401 6404 6407 6410 6413 6416 6419 6422 6425 6428 6431 6434 6437 6440 6443 6446 6449 6452 6455 6458 6461 6464 6467 6470 6473 6476 6479 6482 6485 6488 6491 6494 6497 6499 6502 6505 6508 6511 6514 6517 6520 6523 6526 6529 6532 6535 6538 6541 6544 6547 6550 6553 6556 6559 6562 6565 6568 6571 6574 6577 6580 6583 6586 6589 6592 6595 6598 6601 6604 6607 6610 6613 6616 6619 6622 6625 6628 6631 6634 6637 6640 6643 6646 6649 6652 6655 6658 6661 6664 6667 6670 6673 6676 6679 6682 6685 6688 6691 6694 6697 6699 6702 6705 6708 6711 6714 6717 6720 6723 6726 6729 6732 6735 6738 6741 6744 6747 6750 6753 6756 6759 6762 6765 6768 6771 6774 6777 6780 6783 6786 6789 6792 6795 6798 6801 6804 6807 6810 6813 6816 6819 6822 6825 6828 6831 6834 6837 6840 6843 6846 6849 6852 6855 6858 6861 6864 6867 6870 6873 6876 6879 6882 6885 6888 6891 6894 6897 6899 6902 6905 6908 6911 6914 6917 6920 6923 6926 6929 6932 6935 6938 6941 6944 6947 6950 6953 6956 6959 6962 6965 6968 6971 6974 6977 6980 6983 6986 6989 6992 6995 6998 7001 7004 7007 7010 7013 7016 7019 7022 7025 7028 7031 7034 7037 7040 7043 7046 7049 7052 7055 7058 7061 7064 7067 7070 7073 7076 7079 7082 7085 7088 7091 7094 7097 7099 7102 7105 7108 7111 7114 7117 7120 7123 7126 7129 7132 7135 7138 7141 7144 7147 7150 7153 7156 7159 7162 7165 7168 7171 7174 7177 7180 7183 7186 7189 7192 7195 7198 7201 7204 7207 7210 7213 7216 7219 7222 7225 7228 7231 7234 7237 7240 7243 7246 7249 7252 7255 7258 7261 7264 7267 7270 7273 7276 7279 7282 7285 7288 7291 7294 7297 7299 7302 7305 7308 7311 7314 7317 7320 7323 7326 7329 7332 7335 7338 7341 7344 7347 7350 7353 7356 7359 7362 7365 7368 7371 7374 7377 7380 7383 7386 7389 7392 7395 7398 7401 7404 7407 7410 7413 7416 7419 7422 7425 7428 7431 7434 7437 7440 7443 7446 7449 7452 7455 7458 7461 7464 7467 7470 7473 7476 7479 7482 7485 7488 7491 7494 7497 7499 7502 7505 7508 7511 7514 7517 7520 7523 7526 7529 7532 7535 7538 7541 7544 7547 7550 7553 7556 7559 7562 7565 7568 7571 7574 7577 7580 7583 7586 7589 7592 7595 7598 7601 7604 7607 7610 7613 7616 7619 7622 7625 7628 7631 7634 7637 7640 7643 7646 7649 7652 7655 7658 7661 7664 7667 7670 7673 7676 7679 7682 7685 7688 7691 7694 7697 7699 7702 7705 7708 7711 7714 7717 7720 7723 7726 7729 7732 7735 7738 7741 7744 7747 7750 7753 7756 7759 7762 7765 7768 7771 7774 7777 7780 7783 7786 7789 7792 7795 7798 7801 7804 7807 7810 7813 7816 7819 7822 7825 7828 7831 7834 7837 7840 7843 7846 7849 7852 7855 7858 7861 7864 7867 7870 7873 7876 7879 7882 7885 7888 7891 7894 7897 7899 7902 7905 7908 7911 7914 7917 7920 7923 7926 7929 7932 7935 7938 7941 7944 7947 7950 7953 7956 7959 7962 7965 7968 7971 7974 7977 7980 7983 7986 7989 7992 7995 7998 8001 8004 8007 8010 8013 8016 8019 8022 8025 8028 8031 8034 8037 8040 8043 8046 8049 8052 8055 8058 8061 8064 8067 8070 8073 8076 8079 8082 8085 8088 8091 8094 8097 8099 8102 8105 8108 8111 8114 8117 8120 8123 8126 8129 8132 8135 8138 8141 8144 8147 8150 8153 8156 8159 8162 8165 8168 8171 8174 8177 8180 8183 8186 8189 8192 8195 8198 8201 8204 8207 8210 8213 8216 8219

WMO 1987

FIG. 9

February 27, 1982 13:35

1233	.....	1900
1234	.....	1901
1235	.....	1901
1236	.....	1901
1237	.....	1901
1238	.....	1901
1239	.....	1901
1240	.....	1901
1241	.....	1901
1242	.....	1901
1243	.....	1901
1244	.....	1901
1245	.....	1901
1246	.....	1901
1247	.....	1901
1248	.....	1901
1249	.....	1901
1250	.....	1901
1251	.....	1901
1252	.....	1901
1253	.....	1901
1254	.....	1901
1255	.....	1901
1256	.....	1901
1257	.....	1901
1258	.....	1901
1259	.....	1901

Digitized by srujanika@gmail.com

3

特許平6-506598 (22)

FIG-3

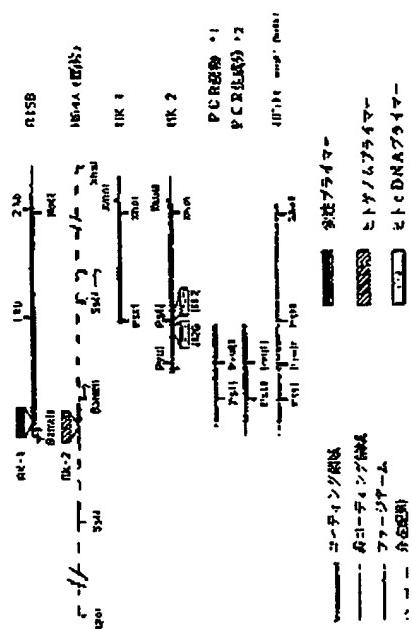


FIG-3

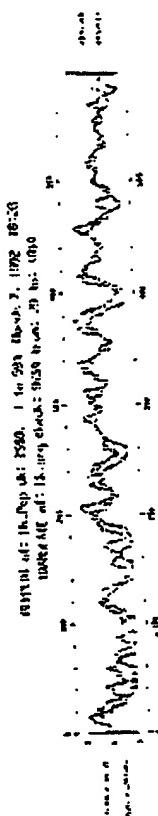
PCR sample 1  
PCR sample 2  
1K 1  
1K 2  
2K 1  
2K 2

FIG-4

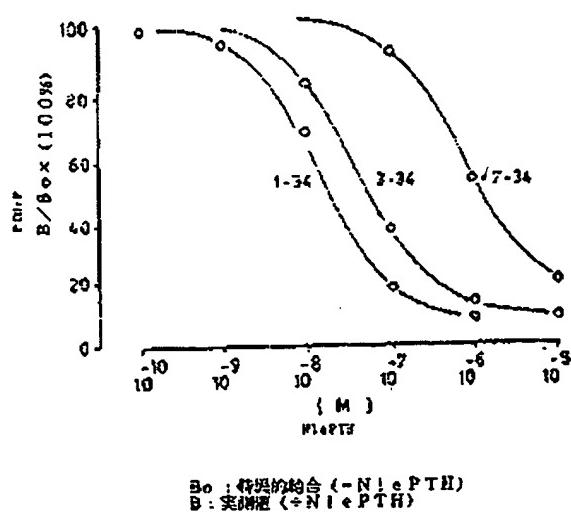
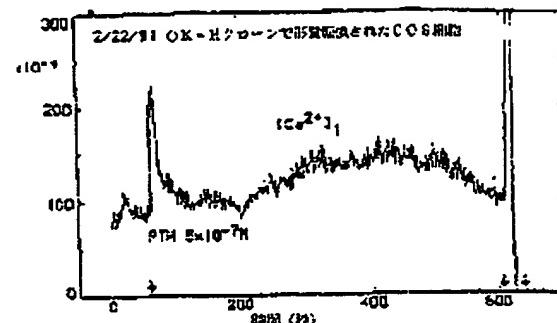


FIG-4



2/22/91 OK-H2O2で蒸発されたCOガス

特許平6-506598 (23)

FIG. 11

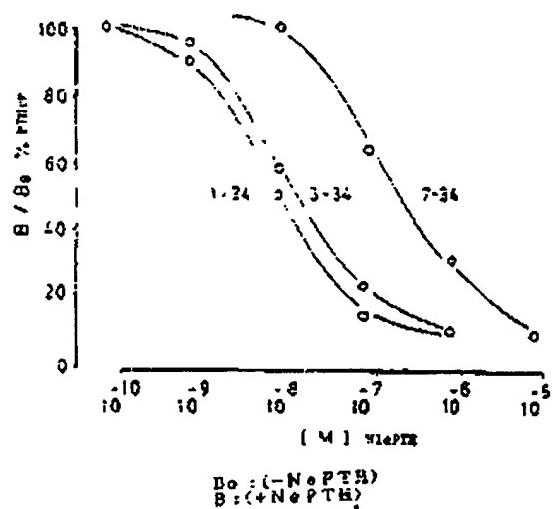


FIG. 12

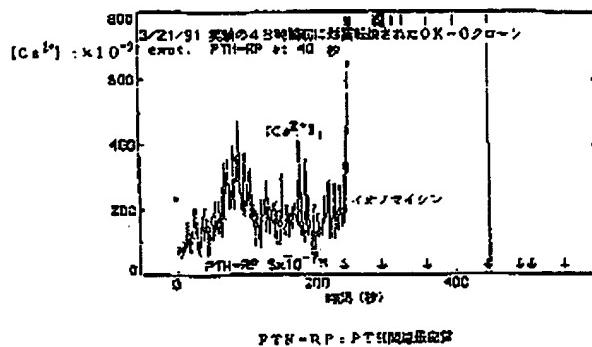


FIG. 13

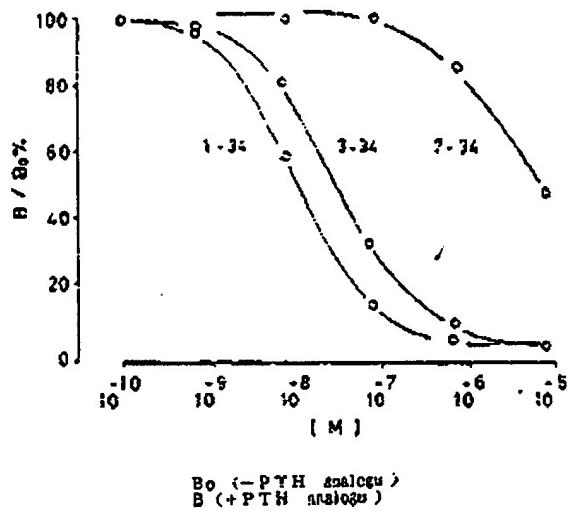
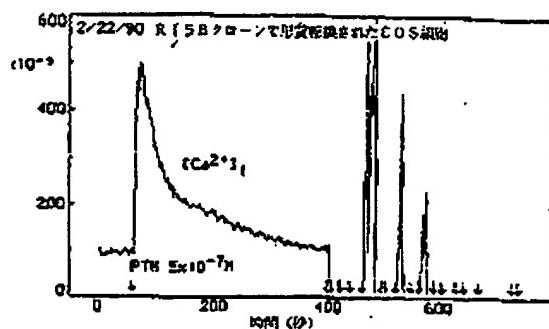


FIG. 13



特表平6-506598 (24)

FIG. 15

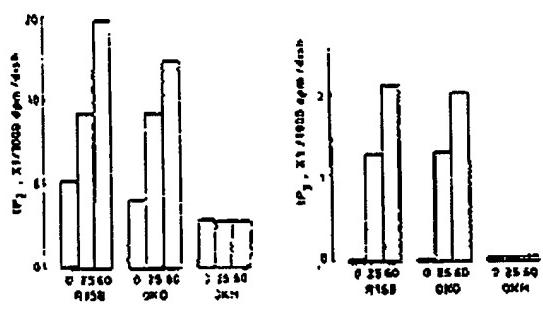


FIG. 16

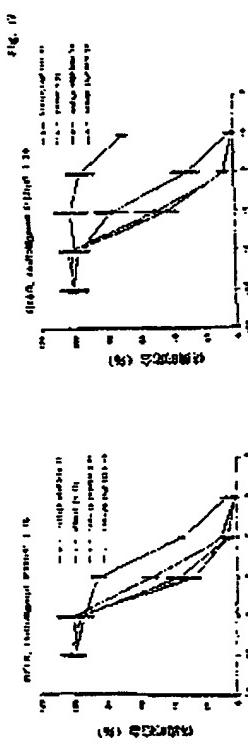
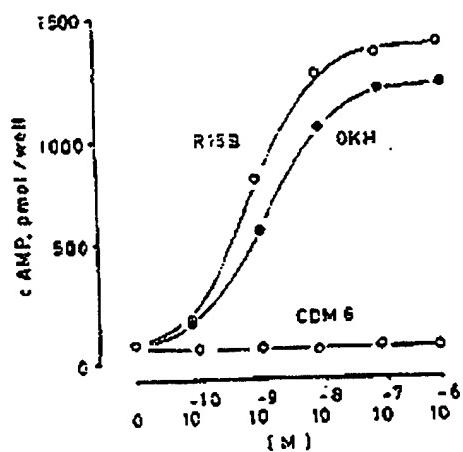
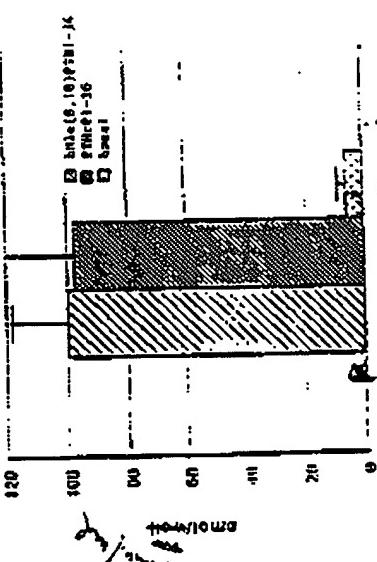


FIG. 18



符表平6-506598 (25)

१३८

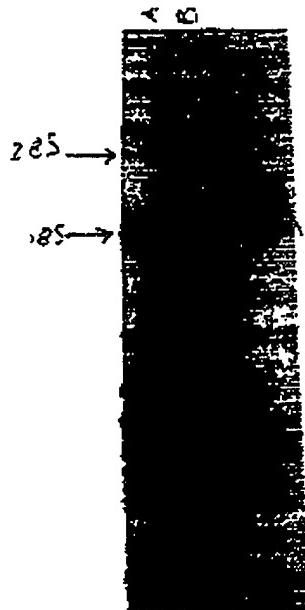


FIG. 28

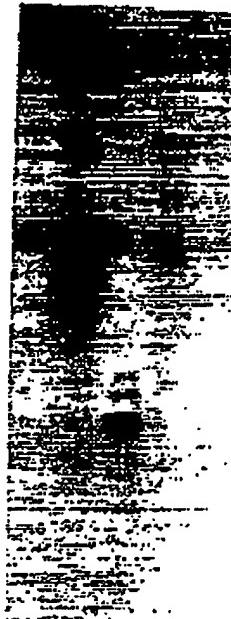
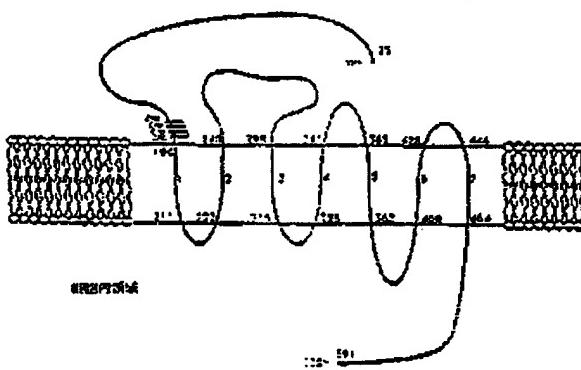


Fig. 3

ジャッキの持つFTU/PTH:プレセプター

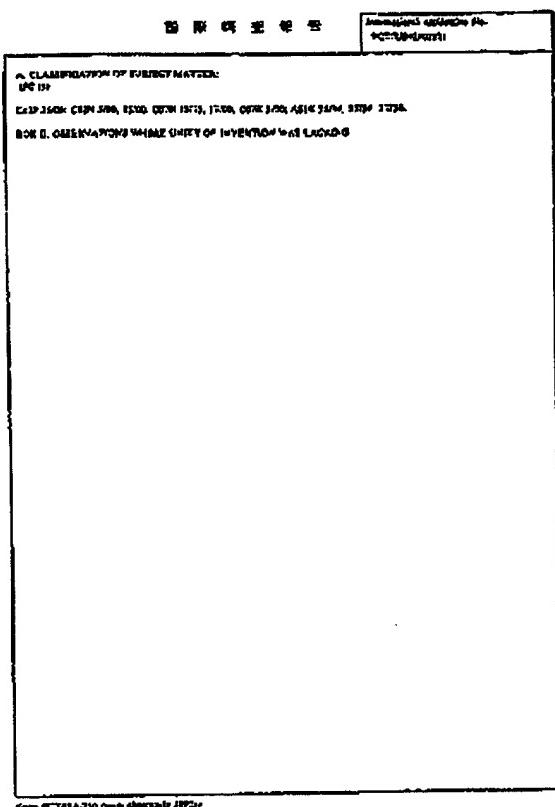
卷之三



#### 7つの世界の主要都市のアーティストたち

1. WESZELAS, VETVILAS — VEZETÉSKÉPESÍTÉS — MEGLÉPÜLÉSI TÁRSAS  
2. TELEK VÁROSOKNÁL — MEGELLENKÜLTÉR, VILÁG VILÁG — MEGSZAVAZOTTAK  
3. MEGFEJLESZÉS

特許平6-506598 (26)



## フロントページの続き

(51) int.Cl.<sup>6</sup> 請別記号 序内整理番号  
 A 61K 39/395 D 9294-4C F I  
 C 07K 7/06  
 7/08  
 7/10  
 16/06 8318-4H  
 C 12N 5/10  
 C 12P 21/02 C 8214-4B  
 G 01N 33/53 E 8310-2J  
 //C 12P 21/02  
 C 12R 1:91  
 C 07K 99:00

(72) 発明者 アボウサムラ アブダルバディ  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブ  
 レインビル フォー コロニアルウエイ  
 (72) 発明者 ジャブナー ハラルド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
 ストン エイト ハリストリート

(72) 発明者 ポツ ヨーン テー ジュニア  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ  
 エストニュートン チェスナットストリー  
 ト129  
 (72) 発明者 シバニ アーネスティーナ  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
 ストン フォー ロングフェローブレイス  
 アブト1004

特表平6-506598

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による修正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成12年1月18日(2000. 1. 18)

【公表番号】特表平6-506598

【公表日】平成6年7月28日(1994. 7. 28)

【年通号数】

【出願番号】特願平4-510035

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

A61P 3/14

5/20

A61K 38/00

39/395

C07K 7/06

7/08

14/205

16/28

C12N 5/10

C12Q 1/58

G01N 33/15

33/565

【F I】

C12N 15/09 ZNA A

A61K 31/00 603 Q

605 K

特製平6-506598

テレホン番号(区番)	
03-11141851	
セイヨウセイ	
1. 当社会員番号	
平成4年 3月26日 03110023号	
2. 沿用する名	
本件との関係 連絡担当者	
姓 名	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ブルーリーストライド 65
名 称	マクニカ株式会社 ピピタル フィーラー・セン
3. 代理人人	
姓 名	近藤義理(アキラ) 03-348129 TEL 0423-21-2310
性 別	(F) 女性 年 齢 -
4. 連絡手段番号 DMS	
5. 連絡手段別名 電話、 faxの範囲	
6. 職種の範囲	
(1) 中国地圖大作別冊の仕事等 (2) 中国地圖を販売する等	

七

ここに記載する用意の効能並びに、米アーリカ有機栽培法によって栽培されたものであり、又販賣する者に付し一歩おかれ正解をさる。

（二）在農業生產上，我們要多管齊下。

周囲が皆一人モノ（オリジナル）で決まりきった日本の音楽では何の変な精神的特徴もあらず、その空虚な物語世界はどこか別物に思える。カバード・ソング時代の歌詞は、原宿、新宿、内、外、内、外、内、外、内、心地の良さなどのモチーフが歌詞のための山登りである。P.T.B.の歌にはこうした歌詞、心地の良さとして山登りのモチーフをレパートリーとして持つ。レベルを上げるために歌詞と分離する方法を取る。カレルブルーノは、古いビデ

では、直角拘束は屈筋の外、3つのカルシクルを斜筋、四頭、腹、股、及び内側に付けるカルシウムの筋肉への導入を有することによって斜筋カルシウムレベルを維持する。アラバマは実際にある筋肉型皮膚<sup>13</sup>の些らを除くことによってカルシウムの筋肉から正確な吸収に立ちます。PTBは筋肉組織を直接吸収し、また、筋肉特に、骨筋筋肉である軟骨筋肉の分化を促進することによって筋肉からのカルシウムを可及的に保証する。カルシウムは、また、筋肉に対するさらなるもろい効果は、筋肉組織がカルシウム蓄積以前の強度、柔軟性、クリアランスの向上、及び活性化<sup>14</sup>による場合を含むうる尾筋膜や筋膜性毛細血管を含めます。PTBによるセレブラー作用のためのエネルギーの活性化も示唆されています<sup>15</sup>が、(Hirsh et al., J. Clin. Endocrinol., 79, 1967)。PTBはこれらの活性をもつとしてセレブラー部分によるアミノ酸シグナルへの促進を述べています。

३४८

本章は細胞内DNAの複製をレセプター、バウベイク、細胞膜蛋白質モルセラビターやG-クラーとしているドナーリピド酸からなる複合体であるDNA全合成複合体とする。このレセプターは、M3に図示しているように複数形（複数形 = 2）に別れており、最も多く見られるのは約30%（残りの約60%をもたらす）、次に多いのは約2%をもたらす、最も少ないのは約1%をもたらす。また、M3に示すように複数形（複数形 = 2）に別れており、最も多く見られるのは約30%（残りの約60%をもたらす）、次に多いのは約2%をもたらす、最も少ないのは約1%をもたらす。また、M3に示すように複数形（複数形 = 2）に別れており、最も多く見られるのは約30%（残りの約60%をもたらす）、次に多いのは約2%をもたらす、最も少ないのは約1%をもたらす。また、M3に示すように複数形（複数形 = 2）に別れており、最も多く見られるのは約30%（残りの約60%をもたらす）、次に多いのは約2%をもたらす、最も少ないのは約1%をもたらす。

符家平 6-506598

さん、アットあるいはアットドット) であり、DNA型別が初め(記述番号: 1)、D2(記述番号: 2)、D3(記述番号: 3)、あるいはD4(記述番号: 4)と示されている。細胞型別も同様にアットドットで示され、アットはセラム  
1000 Type Culture Collection(ATCC) にて示され、ATCC番号をD5-D7あるいはD8-D10と記して示されている。また、ライドの10カットマークが細胞によってコードされることである。上記のD5-D8は、この会社の規則によって(例えは、細胞株を示すセレクト)、あるいは生きたセレプターのタイプをコードするDNA型別を含むるペクターー[これは細胞型別(例えば、ライドマー)を形成するペクターの染色体から分離されたものもしくはペクターーとして細胞を示すものも切れる]など、アビリティペクターー(あるいは二重記録されたDNA) を含む細胞。または次元で複数の細胞を示す(例えは、細胞株、あるいは複数細胞群のような複数種) が細胞型別を示すことである。"実質的に複数"とは、少なくとも二つの細胞が本物のペクターー(あるいは、細胞によっては生成されたリバ RNA) を含むことを示す。正しいのは、このペクターー(例えは、第15章) が高表現能のミンセルセラムへの導入(例えは、ペクターーを導入され、あるいはペクターーを形態化された細胞) によって示すことである。

別の方法を示すと、本項は、第15セクションで示すペクターをコードしている細胞をDNAG子の表現によって生成される複数のセレブターー、並べては細胞表面細胞ミンセルセレブターー(あるいはその本質的に生成されたリバ RNA) を分析すると、"実質的に複数細胞に複数"とは、それが自然状態で結合している蛋白質の複数を実質的には示さない事態のことである。

現実に計算すれば、本項は、日本代理にて存在するこの発明の特許セクターーの面倒を負わざりアシチド技術とする。実質的には、このホリヘアモード、即ち技術者自身による手作業的測定法によるモニタリングと組合せる方法を用ひ白黒化性(即ち反応する時計装置)をもセレブターーの活性を示すことである。所述する実験では、この操作は少々とも多くのデータの収集として、データベースから選択される記述を有する。

(a) THE THREE EASY FDR LOK ITIVO: (記述番号: 5)

(b) YLYSGTTLDEAERLVEEL, (既存番号: 6)  
 (c) YTFSLYEAHTHYWELVCG, (既存番号: 7)  
 (d) Y-BATLANTGNDLSESGHKEWLQVP, (既存番号:  
     8)  
 (e) PYTDVSQTLWG1QMHVBM, (既存番号: 9)  
 (f) DDYFTKEEGIPLLHRQA, (既存番号: 10)  
 (g) PEEHLHCTANY, (既存番号: 11)  
 (h) EKSYLWGFTL, (既存番号: 12)  
 (i) VLAJKTLLRSTPACKDTRGGYPELLE, (既存番号:  
     13) 未定  
 (j) RTR (既存番号: 14), 少々こじらかれた形のダブりが、今は上位の既存番号  
 が付いた (k) - (l) の組合 (アプロード) で、日本語がモジモジ、あるいは  
 音節を複数モジモジ複数モジ複数モジ [ここで「モジは「マニタガ: analog」] など、そ  
 れかが似似ならうやアプロードとがくともも 0% (そして既存しないのは少なくとも  
 10%) 因縁の複数モジ複数モジ複数モジを結合するもちを特徴でもの。既存番  
 号は、その他のモリーブド (複数モジ複数モジ) の全般にとって三並されらるか。  
 それは多分 (8a) から、生物学的どうも化物的で手元に見えない (あるいはそれ) であ  
 ることが多めらしい。此番例はこのようなオリヘブロドを生成する力が要求され、  
 この範囲には、本発明の範囲をレセプターへ、あるいはレセプターへの話はをコードして  
 いるのがそのためのDIN-Aを含む動作を特徴すること、及びこの範囲を、それを含  
 むDIN-Aからボリーブドが生成可能である (もしくは今すぐ) でこれが示すことが特  
 徴的である。

既存例は、また、この範囲の初期化レセプター (既存されたトドのPTB11 モブタ  
 ルのようないわゆるモルソンヒセプター) と既存の力を共有する既存のものも所  
 在 (モルソンヒセプター) 以外に他の要素をも特徴とする。この  
 よりうなはれは、既存して (1) で初期の構造レセプターの特性を含むボリーブ  
 ド、あるいは (2) 既存方に含まれる本発明の構造レセプターを用いること  
 によってもたらされる、このをはじめ、既存が、又は既存に組みこむレセプター  
 (例え、レセプター-オフのノード) が持つする既、レセプターによって既存に組

どここれかスケートは他の一歩を飛ぶするもの)を押印(もと、本分的に、手書きは自己に認定する)すら複数をゆきこぎがましい。規範が実際面において、本筋活用の際に四半期報示ルモンセアリ…と多額開業率を実現する能力をもつ。PTDレセプターの重複<sup>④</sup>は、アダニルシクタービーの活性化、あるいはアダニルシクタービーの活性化をもたらすことを示唆する。

とくに本筋は、あれ上げておこる間に、(e) ふれぬ地の隠れヒセブニア(?)をもつての隠れヒセブニアの隠れヒセブニアマド。あるいは(c) ふれぬ地の隠れヒセブニアに対する活性をもつての隠れヒセブニアが報告される。これらの結果を踏まえ、半導体の活性化ヒセブニアによる活性度量を比較する結果では、ヒセブニア活性を測定する手段を充実する。各活性度量結果において、本筋切のアビティマドに付してレセプター、PTDレセプターの活性、及びPTDレセプターと活性度量を算定する結果が見出される。このうちのアビティマド活性は、PTDレセプターとPTDレセプターと算定する結果や、ルーチン化した結果の活性を、これには活性化能のものと測定するための活性度量として利用である。

本筋切の活性度量プローブノン、既に上手の一歩を飛ぶが、既存してアバーナル化する。あるいは本筋切の活性度量ヒセブニアに因るが、いかなるも活性化在にせず、その結果ヒセブニア同様、グローバル化することも無にし、不活性化成の活性化をもたらす。

本筋切の活性度量などを計算は、以下の評議室で既存を算出と既存の問題から明らかにしなければならない。

新編の茶道文庫

第8. 附記する事項を下る。

■ M1はオキナワの船団のPT11/P1THとPレセプターフォーン、OK-N  
モードをしているがビームが弱いのである。M2の船名は「」。  
M2はオキナワの船団のPT11/P1THとPレセプターフォーン、OK-O  
モードをしているがビームが弱いのである。M3の船名は「」。  
■ 1日目も、1つの船団のPT11/P1THとPレセプターフォーン、R15Bモード

ードしているは歌とアミ「愛の記憶のスカル」である(配信開始・3)。

MSはOK-3、OK-8とER15の記述アノ記載列を校列西回れに比べて述べておいたものである。

おおきなトロピカルPTEROPLESをコードして、もはやアーチーの  
運営が大変でも（目次第4）。

既に述べた、ヒトのPTH/PTHrP受容体-αcDNA、ヒトのγ-ミオDNAを用いて合成したPTH/PTHrPレセプターをコードするcDNA

日本社はトヨタの車両を販売する。トヨタ、日産、スズキの車両を販売する。トヨタの車両を販売する。トヨタの車両を販売する。

図6は10K-11セグメントCOS4数のPTB-Pの組合を示すグラフである。

図1はSOK-Kを含んだCOS細胞におけるN1c1T3Rによる細胞死の  
過程を示すグラフである。

図1:レーザーを用いたCO<sub>2</sub>吸収スペクトルの観察を示すグラフである。

141267K-048 じゆこ388=48CN1・FTK=33N88  
57ルンバの例を示す。以下である。

（1）338158を入力してC0848-2PTH・Fの結果を表示させよ

• 84

PI 10R 15Bを入したCO3組成におけるNi + Pt比による結果

車で人や車の事故をみてシタンでも。

MISSOURI, OKLAHOMA, TEXAS, AND COLORADO

ヨルトヒュンゲンに於けるノントーライツ族の政治的統治はナチスである。

1916ACUN-B. OK-H. H 158をもじ入れてCCENに記入する事

アフリカ大陸の大部分を占めるアフリカ大陸をアフリカ大陸と呼ぶ。

符表平6-506598

例7.2はセヒーの例題（p.30）をもとにした例題である。PTB1/PTB2/PTB3セヒーを一括して表現しているのでこの3種類への“”（一括PTB1/PTB2/PTB3）(ACB) 天王寺””1-階PTB1-F (1-30) (セヒー) の記述を不1セヒーである。見合するリソースには、PTB1(1-34) (セヒー)、PTB2(1-34) (セヒー)、PTB3(1-34) (天王寺)、PTB1(7-34) (セヒー)が含まれる。データ化実験結果のページ1として不30、少なくとも2つの改行した状態で示すことができるものである。

は「うは」と口の情熱のトセアターを…過度に発揮しているCOCO嬢様におかれ  
て、部屋内のAMFPの歌名別歌名をすぐラフですら、データーは本邦人士感想を含む  
し、歩きとも300曲としん張天気をさるものである。

例19は他のトマ音源（A）とS&OS-2音源（B）から作りられた映像RCA-1-10（ビニルレコード）のノーナンバット部分の表示である。プロトヒビット音源はFTH/FTH/PTH/Pレモテープで記録している先手性のCUEPAとハイライトを抽出して、283と183のリボンマークEIAバンドでの表示がなされている。

既存のヒトのゲノムDNAを用いた、*Kpn*Iを用いてもこのマーカーで検出されない。これは、このマーカーが複数の等位形を持たないためである。

図2：HRISBEによってコードされているオーバーライドOPTB/PTRP  
セクターの構成における問題を示す例である。

七

二級 [N16'''. Tyc''] DPTH (1-34) 75 F (PTHE (1-34)) . [N16''' Tyc''] DPTH (13-34) 75 F (PTHE (3-34)) 75 F [N16'''. Tyc''] DPTH (5-34) 75 F (PTHE (5-34)) 75 F Bachem Fine Chemicals  
CAGS號碼：[Tyc''] PTHE 211-38) 75 F (PTHE 211-38) 75 F (Neutmen et al., Endoc

monology 11:1-1230, 1985) が示すように、Appreciated Biosystems Synthesizes 420 Amino acidsした。カルペクタミオニカルボン酸(DNBM), EDTA/トリプシンを含むタンパク質はWICCO (Groton Island, NY) が販売する(BSB) CHROMICONE Laboratory, Logan, UTで合成した。各種のcRNAはスルボジン、アツリカ、大西洋岸アーリヒマンドウによって合成された。オリゴヌクレオチドライダーニング Biosystems 390B DNA Synthesizerで合成した。既報本稿、フレック病、T-лимパチオцитカーゼとT-DNAはE. coli, New England Biolabs, Beverly, MAから購入した。チヌラバクサウランゲル、Eucalyptus Gunnii、イソラシナ購入した。すべての細胞は日本細胞の培養細胞のものであった。

使用された細胞名: COS7細胞, ORIGEN, 5-605-2細胞, CHOC細胞, 4-172細胞, LLC-PK1細胞, CCLM-10細胞が主だ。また African Type Culture Collection (Rockland, Maryland, Maryland, USA), ATCC, ATCCL1650, CRL6531, RHEB3, CCL31, CCL39, CLO1, CRL1114など多くの細胞種が販売されている。ROS17/2 TEROS 17/2 BRE細胞はHodgen's (Merck Laboratories, West Point, PA)で販売されているのが最も多くあります。MC-3T3細胞はヒト骨の細胞種から得られた細胞で、株式会社千葉化成(千葉市)で販売されています。

日本、中国、日本）を送りて販賣せらるゝ事無し。  
ハーバードUNIVERSITYの所長、CH. W. STACEYがANTERIOR、RIGHT  
角（H. A. Bioproduction, Walkerville, NB)  
のもの。左の、10X拡大した所で、右はNORMAL倍  
(Grand Island Biological Co.) 10X拡大と  
比較して、左の3分の1位に過ぎない。右は2分の1位に達す。

のを机に突き、トリプシン活性によってが死体をされた。

二二二

ERNAH 等の報告の HMD (R03) 構造  $17OS$  17/2.61  
とよく似た構造 (R03) である。ダフエンソリドンカルボキシル酸  
KEMMELICH et al., *Biochimie* 1961; 1313.  
1977; CHIREWITZ et al., *Biochemistry*  
1974; 5294. 1979; KAMCSIKWADEKNEKOM (Gilean  
et al.), *Biochemistry* 1974; 2633. 1974) は  
アラジデ酸 酸と RNA-RNA (mRNA) は、AVIV 和  
JER (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975; 62: 140  
85. 1972) が見出し、ARNAS が UTP-TGA と (Phar-  
acis. Pluckemin, NJ) を見出している。ROS 1  
7/2.8 mRNA から DNA がアセチル化 (U. RÖHLICH AND G.  
LÜDERS AND F. HOFMEISTER) (Proc. Am. Acad. 1976; 262, 19  
63) が見出されている。サココドロマツアーテーと/or, グリソノウ  
マツアーテ-6794-1-と/or, UNAR, AN が見出され ROS 17/2.  
8-2300KEMCSIKWADEKNEKOM (AVIV et al.; R03) + C  
DNA-Biotin カー (AVIV et al., See Piego,  
(A) の構造。5-20%の濃度で 4-6時間 (1298. 9%, 0  
UGS) によってサイズ選択的である。サイズ選択的 DNA は、す  
て、HMD-ソルビトール-N-ヒドロキシ-アセテート-ペ  
DNA (AVIV et al.) が人乳頭膜癌細胞の細胞内にアセチ  
ル化される。AN, 3'-LES-カルボキシル酸と, 3'-ウツルエ-カル  
ボキシル酸 (HMD-1/P3, AVIV et al.) が細胞膜の HMD に付  
く。P3-カルボキシル酸, 3'-のカルボキシル酸と/or, 3'-レニンを  
シトラクターゼ活性を有する。ソルビトール-N-ヒドロキシ-ア  
セテート-ペ-カルボキシル酸と/or, ソルビトール-N-ヒドロキシ-ア  
セテート-カルボキシル酸と/or, ソルビトール-N-ヒドロキシ-ア

のものが既に多くの種類のが報告されていることが出来る。実験した便では、今まで半導体  
を用いた場合、アクリル-EDTA-Na溶液は(Hevesi, Auschol et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley Sons, New York,  
1985年を参考のこと)により分明された。これらDNAと、今までDEAE  
-テキストラノン溶液に吸い込まれて「サトウラスコ」(Nusse, ラン  
マーク)中で示すものと同様にして培養されたカリカリミクサムの細胞(CO  
細胞)に作用するかの、問い合わせる。

RCMを用いたいわゆる強制的電離離子化法で、電離セル（ノブリ甲式静止板）を用いて、  
レーザー光（PTB/N-1760P）のレセプターを充電する能力のあるプラス  
チルを電離離子化する。Geskeらによると、この方法は、(2)E0  
J. & 8376, 1989) において、これにサイトラクスコトマの  
EAE-ゲテオストランをも含むいくつかの化合物をして行った。導入してお  
る初期、強度が最高となる (Yamamoto et al., 1981, Endocr  
20:615-622) 時点は、(1981) を用いて、その強度を算出して、  
そのユニークな時間と強度は、大き、時期的に正確に一致して、“(1)-  
EAE [Tシド]”PTB-HPLC (1-36) との結合能が検出された。他の  
例、強度は、(2)EAEのマトリケーラブルヒドロキシ酸され、1光子のビラチンと  
結合された。サイトラクスコトマを用いた後、水の酸濃度測定用マイド電極をモニタ  
ーで用いられ (Rhee et al., 1990, Kondo, Ruchhoeft et al., NY)  
に示した。そこで、(1)EAE-1-36は強度、スペクトルは異なり、強度は、(1)  
EAE-1-36は強度と結合された。各ラフミンのウラシングは同じ固有強  
度 (CN-HPLC) で示された。EAE-5強度からもウラシング-1-36のシグナル  
がEAE-1-36強度からもシグナル-PD-1-36のシグナル、(10, 000強度) タイ  
ムコンピュータで示す。PTB/N-1760Pセプターを充電している3-4個の  
結合された COSM-5強度が得られた。これらのペルヒドロキシ酸は得られた。リバ  
ナード電離離子化装置によるものに似ている。そして、シグナルの強度は、  
強度を検出することの出来るレーザー脱水素化法で示すことが可能である。  
EAE-PTB/N-1760Pとよりアーティエキスノブリ甲式静止板とレーザー

特表平6-506598

કર્મ-સાધન

ハイブリードから、細胞内側のクロトンがマクリートとされた。既存のクロトンはアラーキド酸で解説され、シメタクテウスDNAが分解された (Sambrook et al., 1989)。クロロシル化された細胞内側、フィヨードDNAから、活性化エンドヌクレオツー (RNase A 10 μg/ml) と GTC 10 μg/ml (ケトリー)、あるいは RNase B 30 μg/ml と GTC 10 μg/ml (ケトリー) を作用して取り出され、次いで粗略な脱リボソームされた細胞内側を用いて DNA Ligase I (Boehringer Mannheim, San Diego, CA) で結合させた後、CsCl (密度勾配) で離析されたクロトンの

ノーベル賞受賞者: CRICK H. S. D. - 2種類のヒト細胞を用いて、シラクサコシアモード (Chloroform et al., Biochem. 15: 3284, 1979) によって得られた。ノーベル賞受賞者の元へ、ヘリコバクテル (H. pylori) の全ゲノム配列が発表された。ノーベル賞受賞者の元へ、ヘリコバクテル (H. pylori) の全ゲノム配列が発表された。ノーベル賞受賞者の元へ、ヘリコバクテル (H. pylori) の全ゲノム配列が発表された。ノーベル賞受賞者の元へ、ヘリコバクテル (H. pylori) の全ゲノム配列が発表された。

ラジカル-15N:ヒトのDNAを SDS/ブロウナー-ゼル (G. E. Dunn-Hallard et al., Eur. J. Biochem. 36, 32, (1973) で用いて示されたが、マウス細胞の -15N-gated DNA<sup>1</sup> によって得た。B. 5%トリニティアルコール酸化物に加え、ニトロセロース (Schleicher and Schuell, Keene, NH) にプロテクトした。ハイブリッド化後は、マウスDNAをクリーニング試料と用いて洗った (Cleary, C. A., Hallard, G. E. Dunn-Hallard, B., 1%SDSの溶液を用いて)。SDS 5%アガロースゲルで電気泳動し、アントシアニンアカイドにて染色した。

卷之五

CO<sub>2</sub>を既に吸収され、クローンがレモアゲーの供給地帯に位置する福井県に移動したものが多かった。

BERGER, Sengen (Biochem 74:5463, 1977)  
BIOCHEM. 25463 P-12-5001 Beaufort NC-  
NC 2 1sequencing syst. United States 2  
In-biomeric Corporation, Cleveland,  
OH 44137 USA.

2014年文博知识·一月期第35卷·总113期

2つの合成したPCRは、以上の2つの熱を交互に加熱してアライヤーを用いて行なったところ、2つのうちの2D-オーバル化されたPTUとPTHがドロップマーク

G - GC  
 (GAT-2) フィンガル酸アミノ酸アミノ酸-R-G-T-1 (L)-SGAAT  
 TCCATGAGCAGGCCGCGGAT-G-配列番号: 3531, 3532,  
 3533 と 3534 ニクローブ RGC125 - カゴヤイシング風味に基づくアミ

#### 1) ラジオミクロンの場における試験的結果.

11) PTTはヒト血清との競合及び酵母によるオキシリックAMP基板の影響。

III-1 PTBIIとPTHrPの筋肉及び筋膜体による細胞内圧の変動をもじらせる  
の個人、及び

17) PTHとPサザンPの結合を抑制するイノシトールリン酸代謝の活性を、上述の各系の測定ではある。

Digitized by srujanika@gmail.com

[N1] + , N1) + , P7r1) が PTH- (1-24) の PTH (N1C7 TH) と PTH (P7r1) PTHBrR-Cl-SG1 が PTHBr (P7r1) は  
Hg<sup>++</sup>I (WENGL, New England Nuclear, Boston, MA) で HPLC (Degree 61 el., 2. Bival. Ch. cm. 1.53 ± 0.01, 1.074) によって分離された。この HPLC によって得られた。溶液に溶かすと、Hg(II) と PTHBr (1%) の TGA ハイドロキシ (TPA) C6 が得られる。C6-Sep-pak カートリッジ (Waters Associates, Inc., Milford, MA) によって、C6-TXA4U が XRD アセトニトリル中に洗出される。この結果は、次のように示す。Fig. 3 で、C6-Sep-pak カートリッジ (9.9 ml x 5 cm, Waters) が用いられたときに得られた。O, 10% PTA + 30–50% のアセトニトリルの洗出液が得られ、全吸光度の 70% が得られた。シクロヘキサンは、2.5 のピークを示すが得られなかった。また、Hg(II) と PTHBr が得られるアセトニトリルのところで得られ、より高い吸光度が得られた。しかし、この部分に用いたとき、洗出液は全吸光度の 65% まで、これが PTH リードペプチド I に相当する。

COS-T-BEST15とウブリーテ、DNEM、1.9%の組合せが活性化PEI-S、1.0mg/1L:マッシュ中、80~95%の合成まで活性化され、D-BAP/ラジカル (Sambrook et al., 1987) により、ヒトミクログロブリンをDNAを導入した14時間後、細胞をトリプシン処理して大アシテック酸液で洗浄した後、0.5mm、Coseal、Coseal

符表平6-506598

うが、M41に、脂質過酸化と $10^4$  U/ml 脂肪酸/油酸で細胞死した。脂質過酸化物は細胞死を引き起こすものであった。更に化合物の自己酸化能を測定した。ラジカルセプターアグリガントが認められた。脂質過酸化は、過酸化脂質生成、 $5.0\text{mM}\text{H}_2\text{O}_2$  リース地図 (pH 7.7)、 $1.0\text{mM}\text{NaCl}、2.0\text{mM}\text{CaCl}_2、5\text{mM}\text{MgCl}_2$ 、0.5%の卵白牛乳見通し液 (EIC 0.01)、5%酸性アラバマ蛋白 (KC B1+1.0 g/ml) にて、 $37^\circ\text{C}$ 、1時間、ES を毛細管浴と空気浴された。 $3\text{C}\text{O}_2$  のない場所、液体浴槽、恒温水槽にて振盪振幅 1.5 cm、4時間、 $37^\circ\text{C}$  1 rpm、ML 19.6  $\times 10^{-3}$  ml の $10^{-1}$ -和成のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とDTHを含むアクリルコートドライバーにて行われた。

「カッパー」君は、英語を略語にして、専門用語を含む命令を0.15NcC1Bで送り走る(3回)、「カッパー」君がわざと誤解することによって失敗した。私が心に迷ったのがなぜ、もう二人に迷惑(4回)INMEOH(3000J)とされることによって失敗された。最初は30分後、このNcHはコロナに敗北した。二回目、二回目の1ドット(20J)1)にまるで始める。四回のやうなときは、英語ではスクエアトロイマー(FACTORY IN SILENT)である。Doxners Grove, TLIで倒立式車、倒立式車を運ぶ荷物の、ノイサーの代名。たとえそれが駄目でもアブレンシオペーションされて、荷物が運ばれておき(切せらしたときのNcH)の、NcH。

३४६

NH<sub>2</sub>-L-AMPの強度は既述 (Abeu-Sumra et al., J. Biol. Chem. 262: 1122, 1987) のようにして測定された。L-AMP-LTRPの強度も、L-EDSAとZnCl<sub>2</sub>MXを含む培地で測定した。次に、既述のKTPは完全にL-TRPとしらべ、37°Cでインキュベーションした。トドキモモ、K562細胞にフレート全株をトドキモモ細胞中に置くことによって評価して。測定は AMP 1 mM の 50 MHz CPMR 中で強度を測定することによって評価され、既述の AMP (Sigma, Sigma, St. Louis, MO) を用いた。各濃度ラジカルノンアツカイニによって処理された、および PCR 大わりにシラーザーとして見ているラジカルノンアツカイニによって処理された。

シビルマーティンの「5:5」マイクロリードクリアントルヌルヌスアルテニア、  
ヨウジヤマコより購入)は、クロラシナTをよりヨウ素化させた。強烈のヨウ素  
は、ヨウ素化されたAMP結合基を含むSSSep-peptidesリソグリソ(左  
側)、M11fold、M4)を吸収することによって発見した。

ICGで測定した。ヨウ化カルシウム試験では、カルシウムイオントラッピングからカルシウムアセト酸ヘリル (ACB) とし、(1,4-トリフルオロ酢酸) (TFA) によって測定された。ヨウ化カルシウム試験は標準試験され、ICGも同様にカルシウムイオントラッピング法 (Waters) によって測定された。カルシウムのICG濃度は、 $10 \text{--} 100 \text{ }\mu\text{M}$  で測定された。また、(1,4-TFA) 10--500  $\mu\text{M}$  の濃度で測定した。この操作によりヨウ化カルシウム試験結果、ヨウ化カルシウム濃度から公算するところが正確にならう。トランザーレー 2000で測定する時は、4ヶ月まで保証である。アセチレイン用いたる石炭灰、アノソナイト、カルシウムはともにヨウ化カルシウムで測定した。結果は(1--10)  $\mu\text{M}$  のICG濃度のものでは測定 (0, 50, 100  $\mu\text{M}$  /テューブ) とヨウ化カルシウム濃度 (ナトリウム (Na), 5) で測定し、トランザーレーとヨウ化カルシウム濃度を測定した。トランザーレーは、 $2 \text{--} 11 \text{ }\mu\text{M}$  で測定された。ヨウ化カルシウム、ヨウ化カルシウム濃度、TFA (pH7, 4)、5 mM EDTA とヨウ化カルシウム濃度に測定された結果は(11 : 1000) が示された。トランザーレーは、0, 2 mM NaCl をヨウ化カルシウム (pH7, 4) で測定して得られた (20, 0.016 ppm /テューブ)。アセチレインはトランザーレーで測定された。結果としてトランザーレーは 1000  $\mu\text{M}$  のヨウ化カルシウム濃度 (11, 20, 200 PBS) でヨウ化カルシウム濃度を測定された。トランザーレー (1000  $\mu\text{M}$  PBS) はヨウ化カルシウム濃度を測定された。ヨウ化カルシウム濃度は、24時間以内で測定され、1000  $\mu\text{M}$  で示された。二液を吸収し、内側の実験室をアーカンバー (X-ray shielded) で遮断した。実験室は Micromedical から販売されるヨウ化カルシウム試験キットとドライヤーでヨウ化カルシウムを測定した。測定の結果では、アセチレイン濃度は、1000  $\mu\text{M}$  /テューブで、トランザーレーから 0.0% を測定するかトランザーレーは 2.0% /テューブである。

レバノンのアラブ連邦、PTB/PTB:ヨルカフ-CDN  
アラブ連邦、COSARU、アラブ連邦アラブ連邦、ヨルカフ

PTK/PTHとP8セグメントCDNAが組み込まれた複数の融合カラムスルトラン酸化物、PMS、O-ANTR、L-アラニン、L-アルギニンを用いた。

Molecular Probes Inc., Eugene, OR 97440  
Subsidiary of Molecular Dynamics

フーリン酸を含むしたカーボナタミ、Fura-1-3 A400W示し、WTの  
 例を含む(40W以上)初期はアディ、スルーヘートした。NFB PBS (M-[2-  
 ベンゾイルオキシ]ビペクチジン-1'-[2-エチルヘキサン-1'-ヨウ], 20;  
 CaCl<sub>2</sub>, 1; KCl, Si, NaCl, 145; MgSO<sub>4</sub>, 0.5;  
 NaHCO<sub>3</sub>, 25; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1, 6; グルコース, 16; 飴ゼリ  
 Ph-2 AM-1 - [2-(5'-カルボキシキセキソル-2'-アセト-  
 ベンゾイルオキシ]ビペクチジン-1'-ヨウ-ヨウ] - 8-(12'-アミノ-5'-メチルオキ-  
 キセキソル-5'-アミノ-3, H, N<sup>+</sup>, H<sup>-</sup>-四塩酸ベングラセトアミメチルエキソ  
 AM, 0.3, 27にてH7, 4, 3.5W空気と6WCC: ときどき発光  
 し、Fura-2 AMを失した場合は、次いで、WTのものと全く同じ  
 時間でFura-1-3-ベンゼリド(6W)が発光で見えた。HEES,  
 24; EGTA, 1; KCl, Si; NaCl, 145; NaG  
 O, 0.3; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; チラミン-C, 3; pH7.4;  
 エチレンの濃度が正確たことをチェックするため、Fura-2 AMと  
 ビペクチジン、時間を見てては常にヘケ-ルを確認した。イシコロービンセン  
 は吸光度で、波長540±10nmにピークがあり、Fura-2 AMの  
 吸光度を標準化して比較していった。それを参考とし、実験スケジュール  
 はFura-2 AMの吸光度が標準化されたときにヘケ-ルを切った。

特表平6-506598

表面のカッティング部は表人に見ておきたい所だ： [Ca<sup>2+</sup>] = 1 mM (R-Bm 1 h) より (EduK-5) S. ここで、Rm 340 と 380 nm における吸光度の値であり、Rm = Rm(max) - Rm(min)。また、吸光度からカルボキシル基の数を算出し、Force = 2 の場合と 5 の場合と比較して、吸光度が大きくなっていた。そこで、Rm 340 nm におけるカルボキシル基の数を算出したところ、Force = 5 の場合の吸光度は、吸光度のカルボキシル基の数で割った結果に一致する。EduK-5 は Force = 2 の場合よりも力強くカルボキシル基を生成する。実験の最後に EduK-5 と Force = 2 を混合して相性を調べたところ、初期濃度 (1 mM) と最終濃度濃度の値の  $\Delta$  を算出した。次いで、Rm 340 nm におけるカルボキシル基の数を算出したところ、1 mM の EduK-5 が初期濃度に切れた。残った色度濃度は、初期濃度が得られた値である： 3.4 - 3.7 に對して 2.24 AM、Rm 340 nm においては、EduK-5 が得られる。

フジターリハビリテーション

FRH/PRINTリセプターと人とのCOS細胞との融合をインシード-ウエーブル法で測定した結果、(Unayama et al., J. Biol. Chem. 265: 4934, 1980).

١٢

二〇四

२०१५-१६ वर्ष-मध्यांतर-प्रा. तुलसीकार्यालय

「ハーバー、おまえはもう少しでアーヴィングの手にかかる。」  
「おまえがそれをやる。」ハーバーは口を閉じた。  
「おまえがそれをやる。」ハーバーは口を閉じた。

トナリアブリーカーを買取られたが、右も左もロボットの良さを握っていた。これらのクローンの代償されたりケガヤギ原因と予想されたアミノ酸配列は、左を、右を「脱酸性：1）及び2）（脱酸性：2）に示されている。H10.5A端頭のH10.5Aトナリアブリーカーを買取れたR11.5Bクローニング、右も左もロボットの良さであった。ラントウのPアブリ/Pアブリ/Fセブリーを決定させたコレクションが原因と予想されるアミノ酸配列図S（脱酸性：1）に示されていく。

3つのcDNAペーパー群、イニシエーター-メチヨニンとしてうなづかれる名前と  
予想よりもメチオニン残基もコードしているコードを行なうときの組合によって定  
士を定めたものと見られる。これらはリバニコニドンの組合には、アンチヌー  
ペラード<sup>1</sup>配列であらうことなく、必ずする特異な組合である。これはたゞこの組合  
でしかなく、3つのレジオペークが現れるべし。C-DNAの組合のレジオペー  
ークに現れるモデル、結局の?回<sup>2</sup>-回<sup>3</sup>モチルへの“道筋”を考慮するに従事す  
る者達は、次も至るところ、3つのアロ<sup>1</sup>、シルバードのレジオペーク、  
アベ<sup>2</sup>、リカント<sup>3</sup>と行なうのは現実的であつた。組合のため<sup>4</sup>、ターゲットを行なう  
と専らをもすことをとどめ、これらが現実的現象、今後さかうしたうのクリーンすべ  
てで、元素分析のドクトルをエンジニアすることをもす。

同様に、OB-1を用いたRT-PCRでは、5'端部のcDNAによってコードされてい  
るアミノ酸配列の変異が確認される。これら2つのレバーファー酵には、全  
てアミノ酸配列の変異があり、T7、8ものアミノ酸の変異がある。このように長い  
長い翻訳したうえでの変異の率は、非常にRT-PCRによってCT-1の変異が確認  
上で問題となることがあると指摘している。これは、HIV-1で見られる変異  
をもとでゲノムをコントロールするための変異であるとする。よく可視化する。

彼らは、3つのクローラー乳化剤を配合し、すべての成分を7%の濃度で配合して、特に表面活性剤である、OK-100%の配合量を1-0%とすることで、洗浄力を落としている。ここでアリーナの洗浄力を88.5%と、漂白効果を持つ、GE-BE-100を1.5%と配合して配合している。これで、OK-OKRは洗浄力と漂白効果だけではなく、泡立ちや柔軟性など、洗濯工程に適応する機能をもつた洗剤となっていた。OK-100とOKR

ノスクローン、BPGC (EAE, HCG) などがあり、S-100で検出された蛋白のヒトGAPDNAmからの。ハイブリッドを用いたDNASE I沈没度数イズのS-100-74% [蛋白質の活性度が測定した(1986年)]。S-100-74%はGAPDNAmをハイブリッド化して得た。RBC S-100-74% (S-100 DNASE活性)、-74%はS-100 GAPC、GAPcとDNAにハイブリドニンゲルアーティスト (S-100 GAPc-DNA) のサブサンプル。蛋白質の活性度-100000DaのS-100 EAE/S-100 GAPDNAmとのPTH/PTHトランセプターの活性率。してあり、この、EAE、EAEのシグナルペプチドと-1000Daのカントンによって示されているから、一匹カウント群活性を

コードイングが始められてから1ヶ月ほどでアリゲーターDNAをPCRで增幅する方法を確立した。ヒトDNAを用いた場合、PCR条件は以下の通りである。  
 プリマーパターン：2つの内側のPCRプライマーは1つの外側のPCRプライマーと組み合って用いる。  
 プリマーバレル：1.5 μMの濃度でPCRを実施する。  
 リアクション混合液：10 μLの量でPCRを実施する。  
 リアクション混合液の構成：  
 - PCRの初期段階：1.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、2.5 U/mlのTaq DNAポリメラーゼ、10 μMの各PCRプライマー、10 μMの各DNA template、10 μMの各dNTP、10 mMの各緩衝液（Tris-HCl pH 8.3）、10 mMの各KCl、10 mMの各MgCl<sub>2</sub>、10 μLの各PCR混合液を用いて用いる。グリシンとEDTAを用いて調整する。  
 - PCRの後半段階：1.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、2.5 U/mlのTaq DNAポリメラーゼ、10 μMの各PCRプライマー、10 μMの各DNA template、10 μMの各dNTP、10 mMの各緩衝液（Tris-HCl pH 8.3）、10 mMの各KCl、10 mMの各MgCl<sub>2</sub>、10 μLの各PCR混合液を用いて用いる。グリシンとEDTAを用いて調整する。

符豪平6-506598

で、ヒト細胞と異なる -2 位置からの組成アミノ酸 (-1 のアミノ酸/レーベー) のノードが、プロトナント側の基團、-2 ～ 5 位から 1 つの正味なハイドロキドを形成する RNA 鏡像が新たに見出された (図 1)。正味のヒトアミノ酸は RNA の C 末端部ではなく、常に反対端の C 末端 (図 2) でフローバーゲルと、1 つの正味アミノ酸もしくはハイドロキドと交換される。最もハイドロキドを形成する 4 つと 5 つ目の 2 つの D 位の RNA が選択され、これらのノードは、ヒトの FT1H / FT1H AR でアッパー・ループの内側手の運動であることを示している。完全なシーケンスアッパー・ループは、機能的アミノ酸の導入を目的のため、1 つのアミノ酸と CDS 断面に一致して配置された。

生産性と品質を保証する  
セイコウヒュアル・CP TH/PTH/PLセフターの特徴と切替装置の多段階  
構造の説明。運転に必要な各部の構成と、操作性を考慮して、操作性を考慮して  
“I-PTH”と“I-N1+2”の両方を用いるテクノロジーが採用され、  
また、リザルト付もしくはAMP付属部、荷物内装材カルタ等の  
構造、及びインストークル類の取扱い等が記載されています。  
ご参考になれば幸いです。

H9R-GK-IIを発現しているのがおそれなり、H9R-GK-IIを発現する  
ことを示すには、これがGK-2B、または、H9R-GPTX (1-3A)、また

西山とMOE が交換しているCCS相関性。"111-N-PTHとPを結合することを示している。これらのデータは、また、PTHとPの結合、西山のPTH (1-34)、またヨウ素-131標識試験されている (即ち、3-34アブリ-3-34試験)。これらは8位と10位にメチオニン代わりにセリンを有する試験版を、そして3-34ニコトニルアラニンの代わりにリジンを有する) 9ラベル試験版が結合の強度調査として用いられた。結果を示すことを示している。西山、OKE-Hを見渡していく CCS相関への "111-N-1-FTRの結合は、PTH に対する結合率とP結合率が結合率と同じで示された時、発現された。これらのデータは、PTHとリヨウ素-131が他のモードによってコードされても、その結合率はほとんど同じであることを示している。

医療機関で最も多く用いられる検査法が、Nephelometryと呼ばれる方法で、尿細胞の吸光度を測定する方法である。この方法は、尿細胞の吸光度を測定する方法である。

図13はK15を抱えていたLUS細胞が、<sup>131</sup>I-PT和Pを結合

ることをもしている。これらのデータは、また、P-THFの場合は、既存の  
TSH(1-3%)、またはアミノ末端で失活されている(例、3-34RHT  
-34RHT)。これらは蛋白と18位にメチオニンの代わりにN-リジンを、そ  
して34位にフェニルアラニンを代わるヒドロキシルアランを有するPTTHが既存の  
他のホルモンとして見られる場合、特にあることを示している。同時に、  
GK-Hと名しているCDS産物がP-THF-N-17-PTTHの場合は、PTTH  
アミノ酸PTTH-P-THFが完全なホルモンとして取り扱われる時、叶ざされたこ  
れらのデータは、PTTHとPTTH-N-17-PTTHが主にLSPによってコードされている  
ミクターに結合することを示している。

例 1-8. R169を示す電極ではCoS触媒が、DE-1を充填している。CoS触媒は活性化された銀と同時に、特に触媒カルシウム活性を増大させている。

141回目、K115を読みながらOK-1をやめているところが印象だ。K116Pで丁度いいNTTドコモによる新宿の新設店、イノーネー三鷹店(EP)とイノーネー新宿店(EP)。新宿駅東口改札前に立つて駅頭が見えるらチャックファンアイノーネーで新宿ではまだ見てることをやめている。ほかに、K117で発見しているものも多かった。K118Pで、もじりで「おはよう」という言葉が出ていた。K119Pで、K120Pで、K121Pで、K122Pによる新設店も、イノーネーで「おはよう」とイントネーションで二度も飲食店にはいかずおもろく飲食店名をやった。これらの中データは、K119PとOK-1によって二つとされているアマゾンでアケーパーさんとリードした。恐い日、やめて大失敗していることを示すする。OK-1とのOK-1の映像で、やがてはOK-1の映像であるので、これらの中データもOK-1と見えてはならない。それでいい。K123Pで、K124PでOK-1は地図でスクリーブ、セカンドルームに隠してあることを示す。

五三六、GIGANTOK—音楽をしていてくれる組が、NICKTHEBIRDによるに決ま、CANT部屋で歌うことを示している。隣の部屋は、OKと名前をしていてもCOS組員に歌ってもらわなかった。NICKTHEBIRDの歌を入るとどちらもCANT部屋ではCANT部屋には歌うらしかった。だからCANT部屋のアダム・シルバーマンは、レセプターの歌を歌

の遺伝子表現の発現部位の反応を否定しないことを不承認してれる。これらのデータによれば、OKRもGRUもHGPとcDNAライブラリーの両方からクローン化されたことをこのようにして証明するに至る。アブリオーナーでは、由来アブリオーナーの名前を冠するを許すことを拒否している。OKRによってはこれららすべてのセクションの結果は、アビニエスノイケルベーゼも、明らかにはグランニン・レセプターアクティビティ（約15%弱）のうちの活性化を示す。測定値は（測定内での誤差範囲によっては比較されよう）、「一括算出」の三重体ペラド硫酸を示す、そのかうし、アブニエスノイケルベーゼ、アルファ-1B、カル、実際であるが、他のジカルペーパーとジカルノイケル、又は既報例に付合い、これらはG-1型蛋白の1つ（G-1）をセロソルジャー「新規品」（G-1カルペーパー）を含む、これまでアブリ

PTH, PTHrpそしてグリーカルニオキシル酸等の半胱氨酸の半胱氨酸側鎖、N末端としてTRIS基を、そして4-18位に氨基ドミン側鎖をもつ「アルブロマイナ」を用いる酵素がPCTP-Rpに存在し、カルボキシ末端側鎖アントリメタノラ、カルボキシ末端側鎖アントリメタノラ、カルボキシ末端側鎖アントリメタノラ等を含む複数のアントリメタノラが存在するとして報告された。また、このPCTP-Rpは、これまで述べた、上述のブライカセチターゼとDNA結合蛋白質（別報題名：「うさぎの」のC19-8-1-512番目のヘテロコトニ型蛋白質を含むカリウムチャネル蛋白質）と共にこれらに結合する蛋白質ともフローネンシン結合能をもつたものであった。300Kのときのサインナルペプチド、アミノ酸組成は次表である。1分：アミノ酸組成と、1分、アミノ酸組成と1分からなることである。主な組成は、110ドミンでアントリメタノラ、カルボキ

特表平6-506598

これらによって抑制された。P15B4、X69AT-1とH5-1によって転写活性化され、複製されたPCR生成物は、X69AT-1とH5-1で切断されたP15B4ベクターに沿うとした。その後浮遊したフラクション、Eを50%は細胞内で複製され、既知が示された。

R+HOは、5'リボミン酸基から14セフレセブリーカー中のものにして一分子のアミノ酸をコードしている。この部位はDNABGRS-7（一級反応）とC11位に（反応発現）して保護された。残差セブリーア、R4とR5の残基をセブリーア、R2を含むしてR1-COS-1-TCHORAMINEはR1TSH（1-3）でR2の反応部位を持つ名前である。R1はカルボニル、R4-R5、セブリーアと一緒に残存するC-7とC-11位に結合するAMF基質を识别する。R1はセブリーアと一緒に結合する。R4-R5はTSHで保護された時、COS-7細胞、あるいはC11位の保護基にもCOS-1細胞の保護基が結合しないかった。これらのデータより、PTH/PTH-Rセブリーアによってカルボニルセブリーアとアミノ酸セブリーアとの結合性などする分子的性質をもつてないと示す。またPTH/PTH-Rセブリーアのカルボニルセブリーア部位のカルボニルセブリーアとの結合性は既に述べたとおりでない。では何が異なるかを説明していく。カルボニル保護されたPTH/PTH-Rセブリーアが結合のG-1位側面のR1

クローラーを含むヒトのPTTH / PTHrPレセプターを導入したCOS-1細胞を用いて、放射性標識PTTH (1-11-3) とPTHrP (1-38) が約10倍の強度で、放射性標識PTTH (1-11-3) とPTHrP (1-38) が約200、400 cpm が検出されたレシピター。R113B (株式会社理化科学) 6.1% 5%と7.1%、1.6% を測定しているCOS-1細胞においては、PTTH (1-34) が約10倍の強度で、10.1、12.3、17.5 cpm と、±±±G と記載することによって明確となつた。また測定したヒトPTTHレセプターは、ウツボウツボセラーゼとラット骨髄細胞PTTH (1-34) と同名目である  $\sim 5.5 \text{ kDa} - 1.6 \mu\text{M}$  (図19)。これらのうちから、それらの位置のアミノ酸配列にも目次と、セクションスクロール (1-3-3) とPTTH (17-34) に付随するものに新しい基盤を示した。PTTH (1-34) は、PTTH (1-3-3) に付随するものに新しい基盤を示した。PTTH (1-34) は、PTTH (1-3-3) に付隨するものに新しい基盤を示した。PTTH (1-34) は、PTTH (1-3-3) に付隨するものに新しい基盤を示した。PTTH (1-34) は、PTTH (1-3-3) に付隨するものに新しい基盤を示した。PTTH (1-34) は、PTTH (1-3-3) に付隨するものに新しい基盤を示した。

セマターに対するこれらからも外れた複数性を示す (HSEとKに付する-3と-5のMTHI) は既に述べた通りである (図16)。このことはPTTH (T-3-5) がセマターカビとして見られる例が多かったが、他にも初期であつた。PTTH (T-3-4) やPTTH (T-3-3) などでも初期性は、これまでのHSEとKに付する-3よりよりもたらさる筋膜をかかつた (PTH 13-3-4) に対して、T-3-Tomie) へとMTHI (T-3-3) に進むに随づき、大きくなる傾向 (N=200頭) で、いずれかのレセプターを発達しているCOS群像において、PTH (T-3-4) とPTTH (T-3-5) は共に頭部側面がガシウムとCAM PC記録を同時に示す (図16)。

ERH/PTKxPレターボックス

ヒトのPTK/PTHRレセプターのアミノ酸配列は、ラット、マウス等他の哺乳類のPTK/PTHRレセプターと比べて、常に高い相似性を示すが、オオバコ、もじ植物のPTK/PTHRレセプターとの相違の特徴性はそれほど目立つではない。オオバコの受容体リガンドの結合位置はアミノ酸の7番目位にセクレターゼ活性部位である。受容体リガンドのAHPFと受容体のカルシウムの調節を説明する。ヒトのPTK/PTHRレセプターイオチャネル及びチャートの構造作用の発現には初期的に利らず、一過性に受容体結合部位のアミノ酸に、つまり、T-2位のセクレターゼ活性部位を持つ転写調節部位をもっている。これには、PTK (1'-3') に対するカルシウム依存性PTK/PTHR (1'-2') に対する反応として活性部位が含まれる。より長い初期調節PTK (3'-3') と他のPTK (1'-3') に対してはこれら二種のヒトのセクレターゼに対する選択性チャネルレセプターと比較してなるほどある。これらも含め、PTK/PTHR-FGF受容体の両側に蛋白質鎖を形成するものはない。それは当然であるが結果的、シグナル伝達に際しては、ヒトアボニヌスの蛋白質鎖とともに自己に結合することを示すからである。

#### PTH/PTHrPレセプターの機能とホルモン活性

PTBとPTBアレセブターの活性化が如何かは、これららがG-蛋白質活性化因子として知られている細胞セプターその他の分子ハーベルなどを抱いていた、よく調べられているG-蛋白質セプターの構造的特徴は、それ

うがすべて、仮説の過検した問題性でして序からなかなかなくとも2つの特徴を持ち、これらの特徴の両方が研究実験を片道するのに十分な効果のものであることがあります。

オダッキッシュの精神、ネットの精神、及びアーティストのPTTH/PTTHアビレシティの不足されるところに問題は、これらがG-1の本質的レセプターやアフィリエーティーのいがれがあなまくまで守らざることを示唆している。ネットなども

の10月1日付で、アレキサンダーの妻アーティセラビア・アーリンガム准  
仕／ムスカウト作曲家アーヴィング・カーラーとの恋愛が報道された。アーリンガム准  
仕は、既婚ドメイン内の恋愛性をこれよりとなり。このことと、これらの  
炎上に生じたも報道活動と、歌のステークは明らかにならぬので、専門のことこそあ  
るが、2曲の音楽作品と、これらアラフ・カーラーの夫アーヴィング・ハーパーとして、歌  
え入れられていてしてアーヴィングでは出だされる音符よりも豊かに成る。加えて、こ  
れらの歌詞には、歌う者と歌詞が、多い音節（例）で、ト音に附つて  
いる（アーヴィング）として音節がちぢれるようするのを解説が全くなくない  
。

特衰平6-506598

も問題はこれまでの沿岸寄港地より、一転して既にプローフ設計に投資する傾向を示し、このプローフ上に既存する他のレセーバーの卸荷と並行に用いることが出来ようである。

クレーンの正規

和洋器その他の国内のための貿易品や輸入についての国際的取引に関するデータが  
トヨタの収集の中に、C D N A M E L I N G S と F R I C K B 、 O H - O M E R G R U P - H  
； F R E E R P G I ； 1 ； 2 ； 3 ； 4 のクロスの一覧を記すアスミト（名古屋）  
が、 American Type Culture Collection  
(アーティスト) に所蔵され、 そこでは、 先づの収集者たる T C C H o . H 6 5 7  
1 . 6 5 5 7 2 , 6 8 8 7 3 , 3 0 5 9 8 , 及び 3 1 5 7 0 と記されている。  
中古の医療機器、 The General Hospital Corp  
トヨタの他、 ATCCがその機器の製作と、 M . L . 健康が可視化された  
は、 その収集内容を最も充実してあることとしている。二つ目には医  
療機器の歴史を知るために用意した、 医療の歴史と医学をさることとして置  
かれる。歴史は医療施設の中の医療中には、 3 7 , F R P 1 . 1 , 1 4 5 3 5  
U . S . C 1 2 などの下、 コリシカナーによって開拓ありと注記されたときに分  
割される。既述された如蜘蛛もあらわせる歴史的な変遷をもって示され、 也またも  
アラスカの歴史発展に対する最も長い歴史あるひとつの項目。そして、 い  
ひもを組む事で、 既述は日本、 シカゴとモルジンの開拓、 またこれに付随する  
歴史、 いすゞからみの開拓、 三井汽船を始めとするいすゞを地盤とする  
開拓、 いすゞの歴史が、 まことに歴史の歴史のための、 重要な記録でもある歴史が  
成り立つたならば、 既述を改めねばならないことを望む。

モリヘアドリ  
モリヘアドリは、F1-5をさらに大きめに育て、ぶどうでいるモリヘアドリ。モリヘアドリの特徴は枝葉がモントレアードーとよく似たところ。モリヘアドリは、枝葉がモントレアードーとよく似たところ。モリヘアドリは、枝葉がモントレアードーとよく似たところ。モリヘアドリは、枝葉がモントレアードーとよく似たところ。

既知内ドメイン:  
**APl-7: FFLHLCTENY (残基番号: 11)**  
**RPI-1: VVAYWWTTL (残基番号: 12)**  
**RPI-9: VIALTKLRTTACRCOTYBQQYSKLLK (残基番号: 13)**  
 これらの既知内ドメインはEdgacrinolase IIAと  
 1: 1230, 1884にによってなされ, HPLCによって確認された。  
 パラベンの発見

ものを含む、さらば、駒形はまゆ子さん。まだ駒形大介さんかモモ江原辰巳君じ  
りとも社会派のモモPTHレセブーの新曲がかかるいは所にもまた別の路線内に  
ある。

間にある特徴的なセクター群には、同様アリノウモドキによってでも異なる。たゞ、既にタヌキムシの代わりにシマノウモドキ(鶴見)、テリヨンの代わりにバラン、リゾンの代わりにアルギニン、等、いろいろは、少しあるが、それ以上の小脳皮質では、他の部位、矢張、また前頭皮質ホルモン、また後頭皮質ホルモン、前頭皮質に近づくセラフ<sup>1</sup>のセラフと改めない程度にそれが挿入していくのが見られる。この領域内を片付ける、あるいは出発点のセラフ<sup>1</sup>のセラフである。

方に同心のなる多孔性セラミックペーパー紙に付し、これらに囲まれた部分ではないが、  
レフラーの記載で、一枚のアルミニウム箔から成る大さな紙(例へば、  
Chou and Faeman, Ann. Rev. Biochem., 37: 251, 1968)の上にうるさい成形紙(糊付紙)が貼り重ねて被覆が  
できると記述されたところが含まれる。紙はドメイン、特に少なくとも 10 個の  
アミノ酸残基をもつ粘度活性 1 倍量、即ちドメイン 10, 相対ドメインの活性  
を指名として表現してある。記述した 1, 10 のアルミニウムペーパーの間隔部、即ち  
内側がドメインとその不活性部であることを示している。

三三七

EP-1: TNITREREVFEDQLOMIVYTC (KMEB:1)  
 EP-2: YVLSGFTLPKAKLIVKHL (KMEB:6)  
 EP-3: VPFPLVHATYYWILVRG (KMEB:7)  
 EP-4: Y-PATLANTGCWULSSOHEKXITQUP (KMEB:8)  
 EP-5: PYTYEVSQIWMUQOMHYEN (KMEB:9)  
 EP-6: DDOVTKEIGIYLHRADA (KMEB:10)

入される。導入された細胞の活性は、反応的に上昇するレベルのG318 (Geneticin, GIBCO)。そしてもしも良好な細胞、イトリセラーーを用いて行われる。

その頃のボーラードをコートして、ひるひるひるは、また、原宿高丘駅前に  
したがうことが多々。駄菓子のセイバー、あるいはセイバー店でをコート  
しているリドウは、反対側の壁にもせんじをもたらすことのある壁紙のカ  
ナルに手を握りながら、バタフライ上を渡される。もしもううちは、ヨーロッ  
パ風洋服。ぐらう。太着に、丸見えで、胸ポケットから馬鹿の手袋箱への  
むかうらし。それによって馬鹿の手袋をそのまま見てくることの出来  
と、裏山のシカやキツネなどをむき出ししている駄菓子をみるのも結構だ。壁と壁  
間に引いた小さな折れ曲がりの階段は、今、こゝの上の物である。しかし、他の学生  
の後をまた次第にしてよい。グラミーヴィングルーム、銀河記念、青葉町駅前アーチ  
、第一音楽室などにまわさねば面白くないが、元気な元気なたのしかいふもの。  
そして、RICHARD PEREZは、これはOliver et al.

(Gene 2:  $\beta$ -Hb, 1977) によって、3つのDNA鎖にわたるアラニンP<sub>1</sub>、谷胱ガラニルP<sub>2</sub>、リジンP<sub>3</sub>の結合が、1つはE.col1から導かれたものであるが、これまで全鎖型を用いて構成されたアミド型である。その構造を理解してそれを生むことができるが、uR8 RBCでは、アンヒビン及びチオサイクリン誘導剤の間にアミドを含む、そのため、既存の全鎖型ペクターの解説に沿って、図表より、あるいは既存それらを参考の遺伝子座をマーカーを使用する。一方で用いられない遺伝子座の解説を除くことは、「遺伝子座」とも呼ぶことは、ここでは、RBC内ペクター、ペクターゼ遺伝子群の記述と並んで、各方向性の組合せのペクターを示すのとを先とされ、遺伝子座を記述する場合の一例に記載する形である。P<sub>1</sub>…P<sub>3</sub>…由來のP<sub>1</sub>ペクター、P<sub>2</sub>ペクター、P<sub>3</sub>ペクター、P<sub>1</sub>ペクター+P<sub>2</sub>ペクター+P<sub>3</sub>ペクター等 (Kishimatsu et al., Nature 202:126, 1964) が記載され、P<sub>1</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>ペクター(ヘニシナペクター)、P<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>ペクター (Cheng et al., Nature 195: 1054, 1977) 及びリソリブン (Lysine) ペクター等 (Goodall et al., Nucl. Acids Res. 10: 1962, 1982)

特表平6-506598

Page 8: 2051, 1480; もちあざ。

本条規則適用セブタ一括回賃、割下のような事実を含っているので、割合内に適用すると、それが想定外へ、かう方に適用を希望して考へし、その結果、その一層なにが認められずなり、一部が割合外で作用し、一部が割合内に作用。これもうお詫び申込まれる相談」セシングーをつづき割合内に認定は、それを割合外、又割合内に在るので、それでてもいい、あるいは、セシングーを割合内に認定せば割合外が、割合内とどちらとも言ひ難いである。

本題の豆豆豆と銀座筋に坂を下る西代と丸の豆豆豆の豆豆豆部分とでなく、アーチド橋上は、光反射しても、鏡に映る波なれることは御用でない。こちらが御用で波なれでも、あるいは御用で波なれで波なれでもかん、それが御用である御用(御文)、シゲルヘルシテ<sup>シゲルヘルシテ</sup>が書かれているが、西代によると、もし、もたらされれば、太陽のヨリアヘア<sup>ヨリアヘア</sup>ではぬれずかねがゆきなことが御用だ。もし、もうてなれや、御用を御用して、御用のヨリアヘア<sup>ヨリアヘア</sup>が御用の全生をからみ分かしけりやなれともい、毛利さんとの御用の毛リヨリアヘア<sup>ヨリアヘア</sup>の御用は、御用はむかひ、御下の方の御用はまくら：

- 1) 3Dに表示されるようなネットの部分のPTH/PTHドリセプターの構造をリードで図面を含み、71/72頁-182から183-を複数枚。
  - 2) ESRで示されるようなネットの部分のPTH/PTHドリセプターの構造をリードで説明した、アミノ酸7-192を6などクリップ用紙等で示す。
  - 3) 図3に示されるようなネットの部分のESRのPTH/PTHドリセプターを示す。

4) PR-1(下記のようす)。

5) PR-2(上記のようす)。

本説明会はペグリオトナ、アライニコ・ナロマ・グリフィーを用いて興味に解答することが出来る。これらがボリュームの教科書、あるいはレッチャーノ等のリザーブド用のPTH/PTHドリセプターに付するセルキン等のPTHとPTHドリセプターは、セラセード、4-CNBドリセプター等のアーロー(ヒルヒル等)によるシリコン又はアルミニウム等、その表面のガリーフィルム等の導入部材などを示すのに用いてある。内部には、1mmのサンドル等、

よりては既に既存のPTB/PTH/PTFBヒトアントボーネルと同様である。Squires et al. (1972) によると、即ち、ヒトヒトペプチドから、結合した「ヒト-成長因子/PTB/PTHヒトセラミド」は、ホモジンのものから、100倍の「ヒト-成長因子/PTB/PTHヒトセラミド」とともに、既存のもの及び(1)のヒトセラミドを加え、即ち、2000倍までなる。4T1で培養することによって分離され、ヒト成長因子、レットセラミンガングリオイドを加え、即ち、成長因子(MGF, BDF, 1T, 2, 3, 4G, NGF)-2個組合せの組合せである。即ち、ヒト成長因子(H15H, DE-0)をヒトE-Hを含むされたCOS細胞組合せのCHOBECI PTB/PTH/PTFBヒトアントボーネルを発現している間隔が、即ち、ヒト成長因子とヒトE-Hを含むされた組合せと、2UG、あるいはヒトE-H-1-4種類インキュベーション後、培養液を吸出する(3回)後、即ち、「ヒト-成長因子/M」、ひいては「ヒト成長因子/H」であるが、ヒト成長因子(S1とS2)の第一-第二と第三回、即ちセクションヒト成長因子(1-4)である。次にIPBSで洗浄し、活性化し、IMMとDMSOを混合してテクスチャーベースで溶解される(もし、「ヒト-成長因子/H」は即ち(1)回)、あるいは1%バクテリカルマトリクルビドで置換し、多孔の試験管で液体を吸き取る(もし、「ヒト-成長因子/H」は即ち(2)回)。

PTAを主張するもう1つの理由は、行動をして才媛（いたは）、レセプターを一貫してしているDNAを注入されたての人の想像のようならぬ（知的自信）の表面にそれを見えていても、その他の原因の問題でセプターは一日も早く解消すると、このように解消され、やがて、うえに、リドカイド等でハーモニ化したときに、それをしてセプターの細胞の死を防ぐことを、また、止むなくこの細胞あるペクターを用いて生成するところがある。因みに、ETH+PTX+チラセプターに特異的センシクローナル性に対する効果を示す。

この研究はチャーチル・リバーラボラトリーが主導して行なわれた。この研究室は、マサチューセッツ州ウィンザーリングにあるチャーチル・リバーラボラトリー (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) のものである。アスコビンのCLP試験と並行して、ACD試験も、RML-LV試験も、この研究室で行なわれた。この3つの試験結果を参考し、アスコビンの安全性を評価した。

は既存のCH<sub>3</sub>中の活性化されたセフローラーと何で違う? - 3-3 球頭 (活性T) インチペートされる。セフローラーは、3-3トリス(2-ヒドロキシ)メチルとして既存のCH<sub>3</sub>中の活性化されたセフローラーと競合する。セフローラーTとP、セフローラーPとP、あるいはセフローラーPとIが競合する。周囲がマトリクスとして既存のCH<sub>3</sub>を活性化する。活性T、活性P、活性Iの中、4-4で既存のCH<sub>3</sub>を活性化される (活性T)。セフローラーTが、次いで、最終的にはセフローラーが活性化され、全く同じCH<sub>3</sub>を活性化される。次いで活性化したセフローラーTは、さらにCH<sub>3</sub>を活性化する。活性Tは、次いで、活性化されたCH<sub>3</sub>により活性化され、その結果Mg、例えは、活性TはCH<sub>3</sub>を活性化する。

レガシーブル - 35

職に就きたりを前にするノリ。ナニ消耗を貯めらるるに用いられたる：

先づコイン（アシニバント）を我おもてんがくアトの御資を今サギに内に注目する。此御身に、不思議味いは我本アシバントで、一月間では9割れる

ロード規約と並んでよく使われる。ハイブリットドライブは、他のものとオランジン/アミノ酸/リン/チミン<sup>1</sup>などを手で粉状に混ぜて服用される。PHTはレセプターと結合する細胞表面受容体であるハイブリットドライブ。以前、3種類のうちPHTLセシマーのコピーを水素原子に不含する構成式(POB177-2)、ミルヒー(EG-4548)で、腎臓の先天性疾患を用いてスクリーニングして発見された。PHTLレセプターに対することは日本を元気を重視するこれらがハイブリットドライブを示して、ヤフコーエンタれる。次のモノクローン抗体は社の社員全員に配布するなど、テラオレセプター受容体とんMP細胞アッセイを用いる一々スクリーニングされることが出来る(表1)。

## レディアード・コニギーのスリーニング

本研究のヒリバタと島田は、さらに過去を総括し、PTTHを主な、並びにシナコニストによる、シニア・シナコニストの活動について、ここに記載のアッセイを用いて、より一層詳しく説明する。

一例をあげると、既記の国際上のPTHレセプターを有するものとの並びに、  
PTHあるいはPTHとP<sub>2</sub>PTH/PTH<sub>x</sub>PLレセプターへの結合に及ぼす  
する影響についてアリヤー等<sup>1)</sup>によると、大脳皮層にPTHレセプターを有し  
てはいるが、P<sub>2</sub>PTHと結合する能力は殆どない<sup>2)</sup>。一方でPTH<sub>x</sub>PLいわ  
ゆるP<sub>2</sub>レセプターと、既記のポリクリオーレルあるいはセミクロタニンの元  
在下、4番目、13番目位にインサードされた、既記されるものは、強烈な  
抑制作用、あるいは受け取らぬものと、あくまで弱弱受け取るものとの二つ。  
シキユハシエンシスは、既記のセミクロタニン(既記の、左側参照)で大き、細  
か、カットカッター等で見て取る活性を完全に引き出されると、PTHレセプタ  
ーとP<sub>2</sub>PTH活性の結合を抑制する特徴、例を除、既記のいろいろなセミクロタ  
ニンの性質も

例は及びアーティストを始め、地元住民、そなわらのアーティストたるいはヤンセンニスなどとして活躍させて、上記の文化振興基金、巡回劇や音楽会、コンサートなどの収入で音楽セミナーを実施してアーティスト育成することを中心とした。また、音楽会開催に際しては、アーティストのマネジメントも行っている。PTA、PTBLM、アーティスト、あるいは市民とも連携をさせたもので、2月は「B4区13-1ソシ

特表平6-506598

チラーー・ラセレーネ・キタンチン, Sigma, St. Louis, MO) の粉末を、5-6 g 分量、37°Cで15分間ペーストされる。サイクリックAMPの濃度は、前述のように、既報のラミナリノアツビ科<sup>1</sup>にて測定されし、PTHレセプターへの結合に対してPTHと競合し、即ち、PTHがcAMP産生によって抑制を示するも内因的、外因的レセプターコンピュートと見受けられる。CNS、PTTレセプターのPTHとの結合と競合しない様な、即ち、PTHによくcAMP産生能を示するが、(即ち云ふ、レセプターが種差がある)を認めるところに、(化物類)アセチルアントラクニストと見受けられし、PTHレセプターへの結合に対しPTHと競合し、PTHの右脇あるいは左脇がcAMP産生を抑制する行動的機能性抗体<sup>2</sup>と認められ、(アセチルセプター)の結合に対するPTHの結合抑制性は、PTHの左脇あるいは右脇がcAMP産生の抑制を示さないが、PTHの左脇あるいは右脇が存在すに、即ち、cAMP産生の抑制を示さないが、もしくはPTHが左脇によってcAMP産生のよりも右脇によってcAMP産生によって抑制される現象がアセチルセプターと見受けられる。

本研究のデータアグリゲートは、経済・行政区画の北と南、本会場の駅舎レセプションとその周辺部であり、1回に登場する間に駆け足する所がちかられような駅舎周辺の構造を観察する。また、各駅・各駅周辺に立ち寄るにあたる場所である。例えば、東京駅シルム通りはカクテル会場のすぐそばの駅前である。JR東日本タワーやJRターミナルビル、PTBビル、レセプション（駅舎）の駅正面建物に隣接している。新幹線タラウムや中央改札口、西改札口のヨルシタシムレベルに直接乗り上昇するのとなるのである。それほか、しばしば、駅構内を駆け抜けたり、やや迷路を進む、乗換、及び移動中の移動、主張する駅舎が駅構内の構造を示す。少なくとも移動は、駅構内を駆け抜けの構造に付随している。迷路かシルム内を走る、直通カナルなどレセプション付近では走行性があり、例えば、駅構内を駆け抜けに走るカナルPTBビルやタラウムを走ることがある。

小川の町には、さる明田七右衛門、吉田支の店屋にいた。これらは、いかにもシケン道を誇り、随分のうるさい。やうやく腰を下すと、口ひ、Pトトモリ一社(PTM)子によって隣地を購入するカルシウム酒(赤芋)。が半額で販売しておきながら、その代わりに酒を全部飲む(貰ふ)。これがまた酒を全部飲む(貰ふ)は、そこで販売しているそれゆえが大きくなる。Pトトモリの酒である。

私の立場において、本件の審査に付けてアドバイストであると見受けられかねない事と認めらる場合は、監査上、例えば、監査実務の専門的立場をもつた監査委員

及び駆逐艦はモコア（イギリス製）、リントンセレン、カムリット等、  
モコア、ダグバート、ロスシルク、ディン、及びヒケンス等モードロのような駆  
逐艦等の増大によって艦隊力をそれいくつもの減少が生じた結果現在の合計ノウ  
ト数は110から120艘程度に減らされた。

西原のうつの方針においては、血癌の専門家ルシウムキノミヨシはイオンを含む電離放射線による治療法を主張する。がんのPTTであるPTT-EとPアントニストの治療の複合によって選択される。ドリカムあるいはヒト血清白蛋白のカルシウム四量体、木本義郎のアンチゴニスや各種免疫活性化カルシウムレームの使用として治療することを勧められる。また同時に、ドマスキンなどP-2HとP-3Hとの内因によって殺滅される腫瘍細胞と腫瘍細胞に対しては、直角シルバーレベルはアンチゴニストの底値である。がんを止める薬もある。

に重複の他の形態を用意して、PTTHをもつPTTHとPに間隔をもたらし、例えば、当時の筆者たる筆者たちが心から信頼する日、それを示すため、又は、恒常性の日、PTTHをもつPTTHとPのレヘルを示すために、その所定場所中のPTTHあるいはPTTHとのレヘルを組み込む形態である。この方法には、PTTHの組合せや中間強度アルゴリズム、組成規則を示すアルゴリズムあるいはPTTHへの結合など、ここに記載されている複数アルゴリズムを用いて、複数のことを示すことができる。場合のレヘルは、既存規則すらすることもある（例えば、代数規則をもつしたPTTHセグメントを用い、円周規則でPに結合させると規則をもつことによって）。(あるいは、既存の規則は、規則規則へのPTTHセグメントの場合は、規則規則をPTTHセグメントに直接的に接続し、規則の先頭をもつPTTHの先頭を Pに接続する形態である。) (以下は、規則規則へのPTTHセグメントの場合は、規則規則をPTTHセグメントに直接的に接続し、規則の先頭をもつPTTHの先頭を Pに接続する形態である。)

を示すので参考のこととされ。また、アスウベル (Ausubel) et al., *Essential Elements in Molecular Biology*, Wiley Publishers, New York, 1987 に記載されているように、タクシーフィルターには逆転PTTHが特徴であるなどとあることから、本論文のPTTH/PTR-PTRセグメントのバッファー、即ち、peptidoglycan、ELTENDEE

片桐の見上からもこころを温かくした点が、此處で強調に用いられる。アーニストは、想当然な重複（例えば、往復丸船）の中で説明され、西園のカルクシムを有するヘベ（102）、かたそらねむ（111）までのと書ききらう所まで、出来れば導導の流れられさせそがり宜しい。何ぞ又日本海舟形、1日、朝風（江戸時抄）アソヒヤ（111）から112までである。近頃は西園のカルクシムを書き替換するためか、更なる手本、専門的な論議をすることもある。西園の記述は、即ちアーニストを受けて既にその解釈がある。

も生産の技術もまた高めのため位用ひここに生えん。PTEリセプターはRIN<sub>2</sub>（あるいはPTEリセプター）とRGAにアンテセンスするRNAをまたTSH受容体GTPにアンテセンスするオクタアミド受容体、気管支炎として見られるところもある。このアグローリキ、例えば、PTEリセプター、PTTHともいはれてアグローリキあるいはアグローリキの気管支炎あるいは粘膜からもしらるるカルシウム濃度に反応して作用する。この方法には、主に、アグローリキ、アンテセンスセクターカリオナキドを細胞質に導入することが含まれている。アンテセンスセクターカリオナキドはアグローリキのPTTHとハイブリッドを形成して、PTTHの翻訳を抑制し、それにによって、この翻訳活性におけるうねりを除してアグローリキの活性を殺す。そしてPTTHに対する翻訳活性を殺す。アンテセンスの翻訳は主生物膜への導入を試みた。内因性、RGAリセプター、PTEリセプター、アグローリキ、TSH、GTHと記載されており、ここではPTEリセプターが含まれている。不活性のOK-X-H、OK-O-OKRはPTEリセプター/PTTHリセプターの生化学的構造の説明、PTEのそのレセプターとの組合の間にによって最も多くされることが示唆されている。この他の伝達能は初期のもののみである。分別されることはできないこととされています。これらリセプターの作用メカニズムは既に、イントークルス状況を示す。活性起来に反応するもう一つには見えないOK-X-H、OK-O-OKRはPTEリセプターとアグローリキの活性化にとそれを示している。その活性の説明とここに示すとされている現象を對して、いわゆる活性種子をもつPTTHとPTEリセプターを手にせよ。これをヨウ素を、次いで反応して（活性化）、PTTHの活性を測定せよ。ヨウ素ヨウ化セチルを活性種子とし、ヨウ素ヨウ化PTH-PTEリセプターを生成することが作れる。このことは、ヨウ素



符袁平6-506598

### 12) 【新規】：3D表示機能！

111

- (A) 記録の数は 1563  
 (B) 選択の範囲は 一般教科  
 (C) 約の算出は 一本目  
 (D) 未登記のものは 既登記

१६३

THICKNESS CHARACTERISTICS OF POLYACRYLIC ACID-CONTAINING  
POLY(ACRYLIC ACID-CONTAINING POLYACRYLIC ACID)  
125  
VEGETABLE OILS  
126  
VOLATILE COMPOUNDS  
127  
WATER-SOLUBLE POLYMERS  
128  
WEATHERING  
129  
WELDING  
130  
WETTING AGENTS  
131  
WHEAT  
132  
WHEN  
133  
WHENEVER  
134  
WHENEVER  
135  
WHENEVER  
136  
WHENEVER  
137  
WHENEVER  
138  
WHENEVER  
139  
WHENEVER  
140  
WHENEVER  
141  
WHENEVER  
142  
WHENEVER  
143  
WHENEVER  
144  
WHENEVER  
145  
WHENEVER  
146  
WHENEVER  
147  
WHENEVER  
148  
WHENEVER  
149  
WHENEVER  
150  
WHENEVER  
151  
WHENEVER  
152  
WHENEVER  
153  
WHENEVER  
154  
WHENEVER  
155  
WHENEVER  
156  
WHENEVER  
157  
WHENEVER  
158  
WHENEVER  
159  
WHENEVER  
160  
WHENEVER  
161  
WHENEVER  
162  
WHENEVER  
163  
WHENEVER  
164  
WHENEVER  
165  
WHENEVER  
166  
WHENEVER  
167  
WHENEVER  
168  
WHENEVER  
169  
WHENEVER  
170  
WHENEVER  
171  
WHENEVER  
172  
WHENEVER  
173  
WHENEVER  
174  
WHENEVER  
175  
WHENEVER  
176  
WHENEVER  
177  
WHENEVER  
178  
WHENEVER  
179  
WHENEVER  
180  
WHENEVER  
181  
WHENEVER  
182  
WHENEVER  
183  
WHENEVER  
184  
WHENEVER  
185  
WHENEVER  
186  
WHENEVER  
187  
WHENEVER  
188  
WHENEVER  
189  
WHENEVER  
190  
WHENEVER  
191  
WHENEVER  
192  
WHENEVER  
193  
WHENEVER  
194  
WHENEVER  
195  
WHENEVER  
196  
WHENEVER  
197  
WHENEVER  
198  
WHENEVER  
199  
WHENEVER  
200  
WHENEVER  
201  
WHENEVER  
202  
WHENEVER  
203  
WHENEVER  
204  
WHENEVER  
205  
WHENEVER  
206  
WHENEVER  
207  
WHENEVER  
208  
WHENEVER  
209  
WHENEVER  
210  
WHENEVER  
211  
WHENEVER  
212  
WHENEVER  
213  
WHENEVER  
214  
WHENEVER  
215  
WHENEVER  
216  
WHENEVER  
217  
WHENEVER  
218  
WHENEVER  
219  
WHENEVER  
220  
WHENEVER  
221  
WHENEVER  
222  
WHENEVER  
223  
WHENEVER  
224  
WHENEVER  
225  
WHENEVER  
226  
WHENEVER  
227  
WHENEVER  
228  
WHENEVER  
229  
WHENEVER  
230  
WHENEVER  
231  
WHENEVER  
232  
WHENEVER  
233  
WHENEVER  
234  
WHENEVER  
235  
WHENEVER  
236  
WHENEVER  
237  
WHENEVER  
238  
WHENEVER  
239  
WHENEVER  
240  
WHENEVER  
241  
WHENEVER  
242  
WHENEVER  
243  
WHENEVER  
244  
WHENEVER  
245  
WHENEVER  
246  
WHENEVER  
247  
WHENEVER  
248  
WHENEVER  
249  
WHENEVER  
250  
WHENEVER  
251  
WHENEVER  
252  
WHENEVER  
253  
WHENEVER  
254  
WHENEVER  
255  
WHENEVER  
256  
WHENEVER  
257  
WHENEVER  
258  
WHENEVER  
259  
WHENEVER  
260  
WHENEVER  
261  
WHENEVER  
262  
WHENEVER  
263  
WHENEVER  
264  
WHENEVER  
265  
WHENEVER  
266  
WHENEVER  
267  
WHENEVER  
268  
WHENEVER  
269  
WHENEVER  
270  
WHENEVER  
271  
WHENEVER  
272  
WHENEVER  
273  
WHENEVER  
274  
WHENEVER  
275  
WHENEVER  
276  
WHENEVER  
277  
WHENEVER  
278  
WHENEVER  
279  
WHENEVER  
280  
WHENEVER  
281  
WHENEVER  
282  
WHENEVER  
283  
WHENEVER  
284  
WHENEVER  
285  
WHENEVER  
286  
WHENEVER  
287  
WHENEVER  
288  
WHENEVER  
289  
WHENEVER  
290  
WHENEVER  
291  
WHENEVER  
292  
WHENEVER  
293  
WHENEVER  
294  
WHENEVER  
295  
WHENEVER  
296  
WHENEVER  
297  
WHENEVER  
298  
WHENEVER  
299  
WHENEVER  
300

特袁平6-506598

ACB 120 120 1000000000 C  
100 100 100  
100

### (3) 電算手續：含記錄與檢視：

#### （二）识别与防范：

(A) 駐車料金 : 205  
 (B) 駐車料金 : 205  
 (C) 駐車料金 : 205  
 (D) 駐車料金 : 205

(x 1) 278

特表平6-506598

政治の東西

1. 他の細胞の細胞膜セグメントをコードしているDNA配列をもつた複数されたDNAsであって、細胞セグメントが、複数個をもつておられるが、この複数個を多くとも30%もの活性を持つクローンが複数を有することを特徴とするDNA。

2. 2. および3に記載されているDNA複数をもつDNAであって、複数のDNAsが複数個をもつておられるが、この複数個が実質的にすべてをコードしていることを特徴とするDNA。

3. 3. 遺伝子群に記載されている多細胞系とDNAであって、周囲DNAの複数個を認める複数をもつておられるが、此複数の実質的にすべてをコードしていることを特徴とするDNA。

4. 4. 本明細書に記載されているDNA複数をもつDNAであって、複数個されたDNAs AATTCG 遺伝子番号 6 8570としてATCCに記載されたプラスミド pBR322 に似ることを特徴とするDNA。

5. 5. 遺伝子群に記載されている多細胞系とDNAであって、AGUUNAC配列が複数個をもつておられるが、此複数個の実質的にすべてをコードしていることを特徴とするDNA。

6. 6. 本明細書に記載されている単純としたDNAであって、自己記憶の属性が、自己記憶に匹敵するといふDNAが、特にハイブリッドを形成することを能らざるDNA。

7. 7. 遺伝子の記載されている多細胞されたDNAであって、複数DNAsを複数個、複数個をもつておられるがDNA配列ヒーリングドットを形成することを能らざるDNA。

R. 試験管に記載されている結果はそれなりに正確であって、而して RIA の実験が記載する如きに示されている RIA 実験とハイブリッドを比較することを試みた。DNA。

9. ベクターの操作機能であって、例題ベクターが既存代数のセルセグマーを含むもいるか検査を含むことを特徴とするベクター。

#### 19. 亂世期に出現した悪意の表現されたD系人を攻撃する凶魔。

しかし、日本語で今に認めておられる御都合をもって、むろ然とお、心地良さざるふに従ふから御足利様もこなーた御のまゝうなづかざらることを仰ねばするや。

12. 本規則に同様の規定を設けて、前記規則に付に各が該委員会に記載の事項を記載する旨を定めることを規制する規則。

16. 重複されたDNAが、既に既存するものをあるいは他のDNAと組合せることで、新たにDNAを作り出すことをコトバとして「DNA複製」といいます。

14. ポリペアテドセトロムはおなじである。

個人を記述する情報は収集せずに済む。  
個人を記述する情報は収集せずに済む。

しかし、細胞質RNAからミクロンセンサー蛋白質の mRNAをも検出し得てゐる。新規一級殻蛋白質の mRNAをアレルサウス法でみるとこれを証明する。本細胞DNAは







## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>5</sup> : C12P 21/06, C12N 5/00, 15/00 C07H 15/12, 17/00, C07K 3/00 A61K 35/14, 37/24, 37/36		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 92/17602</b> (43) International Publication Date: 15 October 1992 (15.10.92)
(21) International Application Number: PCT/US92/02821 (22) International Filing Date: 6 April 1992 (06.04.92)		(74) Agent: CLARK, Paul, T.; Fish and Richardson, 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).	
(30) Priority data: 681,702 5 April 1991 (05.04.91) 864,475 6 April 1992 (06.04.92)		US	(81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CA, CH (European patent), DE (European patent), DK (European patent), ES (European patent), FR (European patent), GB (European patent), GR (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), MC (European patent), NL (European patent), SE (European patent).
(71) Applicant: THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS [US/US]; Thirteenth Street, Building 149, Suite 1101, Charlestown, MA 02129 (US).		Published <i>With international search report.</i>	
(72) Inventors: SEGRE, Gino, V. ; 58 Sedgemoor Road, Wayland, MA 01778 (US). KRONENBERG, Henry, M. ; 48 Hastings Road, Belmont, MA 02178 (US). ABOU-SAMRA, Abdul-Badi ; Four Colonial Way, Plainville, MA 02762 (US). JUPPNER, Harald ; Eight Harris Street, Boston, MA 02109 (US). POTTS, John, T., Jr. ; 129 Chestnut Street, West Newton, MA 02165 (US). SCHIPANI, Ernestina ; Four Longfellow Place, Apt. 1004, Boston, MA 02114 (US).			

(54) Title: PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA ENCODING SAME

## (57) Abstract

DNA encoding a parathyroid hormone receptor; production and isolation of recombinant and synthetic parathyroid hormone receptor polypeptides and fragments; antibodies to parathyroid hormone receptors and receptor fragments; methods for screening candidate compounds for antagonistic or agonistic effects on parathyroid hormone receptor action; and diagnostic and therapeutic methods of these compounds are disclosed.

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	France	MN	Mongolia
BE	Belgium	GA	Gabon	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BC	Bulgaria	CN	Guinea	NL	Netherlands
BJ	Benin	GR	Greece	NO	Norway
BR	Brazil	HU	Hungary	PL	Poland
CA	Canada	IT	Italy	RO	Romania
CF	Central African Republic	JP	Japan	RU	Russian Federation
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
DE	Germany	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Denmark			US	United States of America

- 1 -

**PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA ENCODING SAME**  
Background of the Invention

Partial funding of the work described herein was  
5 provided by the U.S. Government, which has certain rights  
to the invention.

The invention relates to endocrine receptors.  
A crucial step in the expression of hormonal  
action is the interaction of hormones with receptors on  
10 the plasma membrane surface of target cells. The  
formation of hormone-receptor complexes allows the  
transduction of extracellular signals into the cell to  
elicit a variety of biological responses. For example,  
binding of a hormone such as follicle stimulating hormone  
15 (FSH), luteinizing hormone (LH), thyroid stimulating  
hormone (TSH), and chorionic gonadotropin (CG), to its  
cell surface receptor induces a conformational change in  
the receptor, resulting in the association of the  
receptor with a transductor molecule, the stimulatory  
20 guanine nucleotide (GTP) binding protein, a component of  
which is ( $G_s$ ). This association stimulates adenylate  
cyclase activity which in turn triggers other cellular  
processes such as protein phosphorylation, steroid  
synthesis and secretion, and the modulation of ion flux.  
25 Binding of other hormones, including arginine vasopressin  
(VP), angiotensin II, and norepinephrine, to their cell  
surface receptors results in the activation of other  
types of GTP binding proteins components such as ( $G_p$ ),  
which in turn stimulates the activity of the enzyme  
30 phospholipase C. The products of phospholipase C  
hydrolysis initiate a complex cascade of cellular events,  
including the mobilization of intracellular calcium and  
protein phosphorylation.

Parathyroid hormone (PTH) is a major regulator of  
35 calcium homeostasis whose principal target cells occur in

- 2 -

bone and kidney. Regulation of calcium concentration is necessary for the normal function of the gastrointestinal, skeletal, neurologic, neuromuscular, and cardiovascular systems. PTH synthesis and release  
5 are controlled principally by the serum calcium level: a low level stimulates and a high level suppresses both the hormone synthesis and release. PTH, in turn, maintains the serum calcium level by directly or indirectly promoting calcium entry into the blood at three sites of  
10 calcium exchange: gut, bone and kidney. PTH contributes to net gastrointestinal absorption of calcium by favoring the renal synthesis of the active form of vitamin D. PTH promotes calcium resorption from bone by inhibiting osteoblasts and, indirectly, by stimulating  
15 differentiation of the bone-resorbing cells, osteoclasts. It also mediates at least three main effects on the kidney: stimulation of tubular calcium reabsorption, enhancement of phosphate clearance, and promotion of an increase in the enzyme that completes synthesis of the  
20 active form of vitamin D. PTH exerts these effects primarily through receptor-mediated activation of adenylate cyclase, although receptor-mediated activation of phospholipase C by PTH has also been reported (Hruska et al., J. Clin. Invest. 79:230, 1987).  
25 Disruption of calcium homeostasis may produce many clinical disorders (e.g., severe bone disease, anemia, renal impairment, ulcers, myopathy, and neuropathy) and usually results from conditions which produce an alteration in the level of parathyroid hormone.  
30 Hypercalcemia is a condition which is characterized by an elevation in the serum calcium level. It is often associated with primary hyperparathyroidism in which an excess of PTH production occurs as a result of a lesion (e.g., adenoma, hyperplasia or carcinoma) of the  
35 parathyroid glands. Another type of hypercalcemia,

- 3 -

humoral hypercalcemia of malignancy (HHM), is the most common paraneoplastic syndrome. It appears to result in most instances from the production by tumors (e.g., squamous, renal, ovarian or bladder carcinomas) of a  
5 novel class of protein hormone which shares amino acid homology with PTH. These PTH-related proteins (PTHrP) appear to mimic certain of the renal and skeletal actions of PTH and are believed to interact with the PTH receptor in these tissues. PTHrP is normally found at low levels  
10 in many tissues, including keratinocytes, brain, pituitary, parathyroid, adrenal cortex, medulla, fetal liver, osteoblast-like cells and lactating mammary tissues. In many HMM malignancies, PTHrP is found in the circulatory system at high levels, thereby producing the  
15 elevated calcium levels associated with HMM.

Summary of the Invention

The invention features isolated DNA comprising a DNA sequence encoding a cell receptor, preferably a parathyroid hormone receptor, of a vertebrate animal,  
20 which receptor has an amino acid sequence with at least 30% (preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and most preferably at least 75%) identity to the amino acid sequence shown in FIG. 3 (SEQ ID NO.: 3): i.e., when the closest match is made between the two  
25 amino acid sequences (using standard methods), at least 30% of the amino acid residues of the former sequence are identical to the amino acid residues of the latter sequence. By "isolated" is meant that the DNA is free of the coding sequences of those genes that, in the  
30 naturally-occurring genome of the organism (if any) from which the DNA of the invention is derived, immediately flank the gene encoding the DNA of the invention. The isolated DNA may be single-stranded or double-stranded, and may be genomic DNA, cDNA, recombinant hybrid DNA, or

- 4 -

synthetic DNA. It may be identical to a naturally-  
occurring, cell receptor- (e.g. PTH receptor) encoding  
DNA sequence, or may differ from such sequence by the  
deletion, addition, or substitution of one or more  
5 nucleotides. Single-stranded DNAs of the invention are  
generally at least 8 nucleotides long, (preferably at  
least 18 nucleotides long, and more preferably at least  
30 nucleotides long) ranging up to full length of the  
gene or cDNA; they preferably are detectably labelled for  
10 use as hybridization probes, and may be antisense.

Preferably, the isolated DNA hybridizes under conditions  
of high stringency to all or part of the DNA sequence  
shown in FIG. 1 (SEQ ID NO.:1), FIG. 2 (SEQ ID NO.:2),  
FIG. 3 (SEQ ID NO.:3), or FIG. 6 (SEQ ID NO.:4). By  
15 "high stringency" is meant, for example, conditions such  
as those described herein below for the isolation of  
human kidney PTH receptor cDNA (also see Current  
Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New  
York, 1989, hereby incorporated by reference). Most  
20 preferably, the animal is a mammal (such as an opossum, a  
rat, or a human), and the DNA sequence encodes  
substantially all of the amino acid sequence shown in  
FIG. 1 (SEQ ID NO.:1), FIG. 2 (SEQ ID NO.:2), FIG. 3 (SEQ  
ID NO.:3) or FIG. 6 (SEQ ID NO.:4); or is encoded by the  
25 coding sequence of one of the plasmids deposited with the  
American Type Culture Collection (ATCC) and designated  
ATCC Accession No. 68570 or 68571. The DNA of the  
invention may be incorporated into a vector [which may be  
provided as a purified preparation (e.g., a vector  
30 separated from the mixture of vectors which make up a  
library)] containing a DNA sequence encoding a cell  
receptor of the invention (e.g. parathyroid hormone  
receptor) or fragment of the receptor, and a cell or  
essentially homogenous population of cells (e.g.,  
35 prokaryotic cells, or eukaryotic cells such as mammalian

- 5 -

(S) cells) which contain the vector (or the isolated DNA described above). By "essentially homogenous" is meant that at least 99% of the cells contain the vector of the invention (or the isolated DNA, as the case may be).

5 Preferably, this vector (e.g., R15B) is capable of directing expression of a parathyroid hormone receptor (for example, in a cell transfected or transformed with the vector).

(Q) In another aspect, the invention features a cell 10 receptor, preferably parathyroid hormone receptor, (or an essentially purified preparation thereof) produced by expression of a recombinant DNA molecule encoding the cell receptor. An "essentially purified preparation" is one which is substantially free of the proteins and 15 lipids with which it is naturally associated.

(X) In a related aspect, the invention features a polypeptide which includes a fragment of a naturally-occurring cell receptor of the invention. Preferably, the polypeptide includes a fragment of a naturally- 20 occurring parathyroid hormone receptor which is capable of binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-related protein. In preferred embodiments, this fragment is at least six amino acids long, and has a sequence selected from the group including:

- 25 (a) TNETREREVFDRLGMIYTVG; (SEQ ID NO.: 5)  
(b) YLYSGFTLDEAERLTEEEL; (SEQ ID NO.: 6)  
(c) VTFFLYFLATNYYWILVEG; (SEQ ID NO.: 7)  
(d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP; (SEQ. ID NO.: 8)  
(e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM; (SEQ ID NO.: 9)  
30 (f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA; (SEQ ID NO.: 10)  
(g) FFRLHCTRNY; (SEQ ID NO.: 11)  
(h) EKKYLWGFTL; (SEQ ID NO.: 12)  
(i) VLATKLRETNAGRCGTRQQYRKLLK; or (SEQ ID NO. 13)  
35 (j) a fragment (i.e., a portion at least six residues long, but less than all) or analog of (a) - (i)

- 6 -

which is capable of binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-related protein [wherein "analog" denotes a peptide having a sequence at least 50% (and preferably at least 70%) identical to the peptide of 5 which it is an analog]. Preferably, the polypeptide of the invention is produced by expression of a recombinant DNA molecule or is synthetic (i.e., assembled by chemical rather than biological means). The invention provides a method for producing such a polypeptide, which method 10 includes providing a cell containing isolated DNA encoding a cell receptor of the invention or receptor fragment and culturing this cell under conditions which permit expression of a polypeptide from the isolated DNA.

The invention also features an antibody 15 (monoclonal or polyclonal), and a purified preparation of an antibody, which is capable of forming an immune complex with a cell receptor of the invention (preferably a parathyroid hormone receptor such as a human PTH receptor) such antibody being generated by using as 20 antigen either (1) a polypeptide that includes a fragment of the cell receptor of the invention, or (2) a cell receptor of the invention which is on the surface of a cell. This antibody is preferably capable of neutralizing (i.e., partially or completely inhibiting) a 25 biological activity of the cell receptor of the invention (i.e., a component of one of the cascades naturally triggered by the receptor when its ligand binds to it). In preferred embodiments, the antibody of the invention is capable of forming an immune complex with parathyroid 30 hormone receptor and is capable of neutralizing a biological activity of the PTH receptor (i.e. adenylate cyclase activation or phospholipase C stimulation).

Also within the invention is a therapeutic composition including, in a pharmaceutically-acceptable carrier, (a) a cell receptor of the invention, (b) a 35

- 7 -

0 polypeptide containing a fragment of the cell receptor of  
the invention, or (c) an antibody to a cell receptor of  
the invention. These therapeutic compositions provide a  
means for treating various disorders characterized by  
5 overstimulation of the cell receptors of the invention by  
their ligand. In preferred embodiments, the polypeptides  
of the invention include the PTH receptor, fragments of  
the PTH receptor and antibodies which form immune  
complexes with the PTH receptor. These polypeptides and  
10 antibodies are useful as diagnostics, for distinguishing  
those cases of hypercalcemia related to PTH or PTHrP from  
those which are not.

The nucleic acid probes of the invention enable  
one of ordinary skill in the art of genetic engineering  
15 to identify and clone cell receptor homologs or cell  
receptors from any species which are related to the cell  
receptors of the invention, expanding the usefulness of  
the sequences of the invention.

Other features and advantages of the invention  
20 will be apparent from the following description of the  
preferred embodiments and from the claims.

#### Detailed Description

The drawings will first be briefly described.

#### DRAWINGS

25 FIG. 1 is a representation of the nucleic acid and  
amino acid sequence encoding the opossum kidney PTH/PTHrP  
receptor clone, OK-H. (SEQ ID NO.: 1)

FIG. 2 is a representation of the nucleic acid and  
amino acid sequence encoding the opossum kidney PTH/PTHrP  
30 receptor clone, OK-O. (SEQ ID NO.: 2)

FIG. 3 is a representation of the nucleic acid and  
amino acid sequence encoding the rat bone PTH/PTHrP  
receptor clone, R15B. (SEQ ID NO.: 3)

- 8 -

FIG. 4 is a comparison of the deduced amino acid sequences encoded by cDNAs from clones OK-O and R15B.

5 FIG. 5 is a comparison of the deduced amino acid sequences of OK-O, OK-H and R15B, lined up according to sequence homology.

10 FIG. 6 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the human PTH/PTHrP receptor. (SEQ ID NO.: 4)

15 FIG. 7 is a schematic representation of the rat bone PTH/PTHrP receptor cDNA, the human genomic DNA clone HPG1 and two cDNA clones encoding the human PTH/PTHrP receptor.

20 FIG. 8 is a hydrophobicity plot of the deduced amino acid sequence of the human kidney PTH/PTHrP receptor. Predicted membrane-spanning domains I through VII are indicated; A, B and C indicate additional hydrophobic regions.

25 FIG. 9 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with OK-H.

30 FIG. 10 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with OK-H.

FIG. 11 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with OK-O.

35 FIG. 12 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with OK-O.

FIG. 13 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with R15B.

40 FIG. 14 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with R15B.

45 FIG. 15 is a graph illustrating stimulation of inositol phosphate metabolism by NlePTH in COS cells transfected with OK-H, OK-O, or R15B.

- 9 -

FIG. 16 is a graph illustrating cyclic AMP accumulation in COS cells transfected with CDM-8, OK-H, R15B by NlePTH.

16 FIG. 17 are graphs illustrating binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled PTH(1-34) (A and B) and  $^{125}\text{I}$ -labelled PTHrP(1-36) (C and D) to COS-7 cells transiently expressing the human kidney (A and C) and the rat bone (B and D) PTH/PTHrP receptor; competing ligands included PTH( 1-34) ( $\square$ ), PTHrP(1-36) (\*), PTH(3-34) (■), PTH(7-34) (+).  
10 Data are given as % specific binding and represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments.

15 FIG. 18 is a bar graph illustrating stimulated accumulation of intracellular cAMP in COS-7 cells transiently expressing the human kidney receptor. Data show the mean $\pm$ SD, and are representative of at least three independent experiments.

20 FIG. 19 represents a Northern blot analysis of total RNA (~ 10  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ) prepared from human kidney (A) and SaOS-2 cells (B). The blot was hybridized with the full length cDNA encoding the human kidney PTH/PTHrP receptor; positions of 28S and 18S ribosomal RNA bands are indicated.

25 FIG. 20 represents a Southern blot analysis of human genomic DNA digested with SstI, HindIII, and XbaI (~ 10  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ). The blot was hybridized with the full length cDNA encoding the human kidney PTH/PTHrP receptor.

FIG. 21 is a schematic diagram of the proposed arrangement, in a cellular membrane, of PTH/PTHrP rat bone receptor encoded by R15B.

30

#### MATERIALS AND METHODS

GENERAL: [ $\text{Nle}^{8,18}$ ,  $\text{Tyr}^{34}$ ]bPTH(1-34)amide (PTH(1-34)), [ $\text{Nle}^{8,18}$ ,  $\text{Tyr}^{34}$ ]bPTH(3-34)amide (PTH(3-34)), and [ $\text{Nle}^{8,18}$ ,  $\text{Tyr}^{34}$ ]bPTH(7-34)amide (PTH(7-34)) were obtained from Bachem Fine Chemicals, Torrance, CA; [ $\text{Tyr}^{36}$ ]PTHrP(1-

- 10 -

36) amide (PTHrP(1-36)) was synthesized as described (Keutman et al., Endocrinology 117:1230, 1985) using an Applied Biosystems Synthesizer 420A. Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM), EDTA/trypsin, and gentamycin were 5 from GIBCO (Grand Island, NY); fetal bovine serum (FBS) was from Hiclone Laboratory, Logan, UT. Total RNA from human kidney was provided by Per Hellman, University Hospital, Uppsala, Sweden. Oligonucleotide primers were synthesized using an Applied Biosystems 380B DNA 10 Synthesizer. Restriction enzymes, Klenow enzyme, T4 polynucleotide Kinase and T4 DNA ligase were from New England Biolabs, Beverly, MA. Calf alkaline phosphatase was from Boehringer Mannheim, Germany. All other reagents were of highest purity available.

15 **CELLS**

Cell lines used include COS cells, OK cells, SaOS-2 cells, CHO cells, AtT20 cells, LLC-PK1 cells, and UMR-106 cells, which are available from a variety of sources including the American Type Culture Collection (Rockland, Maryland), Accession Nos. CRL1650, CRL6551, HTB85, CCL61, CCL89, CL101, and CRL1161, respectively. ROS 17/2 and ROS 17/2.8 are available from a number of sources including Dr. Gideon Rodan (Merck Laboratories, West Point, PA). MC-3T3 cells are derived from mouse bone 20 cells and are also available from a number of sources including Dr. Chohei Shigeno (Dept. of Biochem. Medicine, Hyoto Univ., Kyoto, Japan).

All cells were grown in a humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and maintained in monolayer culture with 30 Ham's F-12 or DMEM medium (Grand Island Biological Co.), supplemented with 5% or 10% fetal calf serum (M.A. Bioproducts, Walkersville, MD). The medium was changed every 3 or 4 days, and the cells were subcultured every 2 35 or 3 weeks by

- 11 -

trypsinization using standard methods.

CLONING

- Isolation of cDNA clones encoding the rat and opossum PTH/PTHrP receptors: Total RNA was initially isolated from rat osteosarcoma (ROS) cells (ROS 17/2.8) and opossum kidney (OK) cells, by standard methods using guanidium isothiocyanate (Ullrich et al., *Science* 196: 1313, 1977; Chirgwin et al. *Biochemistry* 24: 5294, 1979), and centrifugation through cesium chloride (Gilsen et al., *Biochemistry* 13: 2633, 1974). Poly A+ RNAs (mRNAs) were then recovered after passage of the total RNAs over oligo dT columns (Pharmacia, Piscataway, NJ) by the method of Aviv and Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 14087, 1972). The cDNA library from the ROS 17/2.8 mRNA was prepared from poly A+ RNA using the method of Gubler and Hoffman (*Gene (Amst.)* 25: 263, 1983). Oligo dT-primed and random-primed cDNAs were synthesized from poly A+ ROS 17/2.8 and OK cell mRNA, respectively (Aviv and Leder, *supra*). The cDNAs were ligated to BstX1 linkers (Invitrogen, San Diego, CA) and size-selected by centrifugation (3 h, 55,000 xg) in a 5-20% potassium acetate gradient. The size-selected cDNA was then inserted into the plasmid vector, pcDNA I (Invitrogen), using the non-self annealing BstX1 restriction sites. The resultant plasmid libraries were then used to transform *E. coli* (MC1061/P3, Invitrogen) containing a larger helper plasmid, p3. The p3 plasmid possesses amber mutations in two genes which code for ampicillin and tetracycline resistance. Using ampicillin and tetracycline selection, only those cells containing both the p3 and a tRNA suppressor gene, which is contained within pcDNA I, were capable of growth. The transformed bacteria were then grown to confluence, and the plasmid DNAs isolated using standard techniques (e.g., see

- 12 -

(3) | Ausebel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley Sons, New York, 1989). These DNAs were then taken up in a DEAE-dextran solution, and used to transfect African Green Monkey kidney (COS) cells, which 5 had been grown to 75% confluence in "sideflasks" (Nunc, Denmark).

Screening for COS cells containing plasmids capable of expressing functionally-intact ROS or OK cell parathyroid hormone/parathyroid hormone related-protein 10 (PTH/PTHrP) receptor proteins was performed according to Gearing et al. (EMBO J. 8: 3676, 1989), with some minor modifications including DEAE-Dextran transfection in sideflasks. Forty-eight hours after transfection, the cells were tested for binding of  $^{125}$ I-labeled [Tyr<sup>36</sup>]PTHrp 15 (1-36) amide, using methods previously described (Yamamoto et al., Endocrinology 122: 1208, 1988), with the following exceptions: the time and temperature of the incubation were 2h and room temperature, respectively. After rinsing, the cells were fixed with 1.25% 20 glutaraldehyde, and rinsed with 1% gelatin. After snapping off the top of the sideflask, the remaining microscope slide was dipped into NTB-2 photographic emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY). After 3-4 days 25 of exposure at 4°C, the slides were developed, fixed, and stained with 0.03% toluene blue. Screening of each slide was performed under a light microscope (Olympus). One pool of plasmid-DNA from ROS cells, and two pools of plasmid-DNA from OK cells, (10,000 independent clones), each gave rise to 3-4 transfected COS cells expressing 30 the PTH/PTHrP receptor. These pools were subsequently subdivided. The subpools were used to transfect COS cells, and single clones were identified that expressed receptor protein capable of binding the radioligand.

(4) | Isolation of cDNA and genomic DNA clones encoding  
35 the human PTH/PTHrP receptor: A human kidney oligo dT-

- 13 -

primed cDNA library ( $1.7 \times 10^6$  independent clones) in lambda GT10 and a genomic library of human placental DNA ( $2.5 \times 10^6$  independent clones) in EMBL3 (Sp6/T7) (Clontech, Palo Alto, CA) were screened by the plaque hybridization technique (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. pp. 108-113, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) with the  $^{32}\text{P}$ -labelled (random primed labelling kit Boehringer Mannheim, Germany) BamHI/NotI 1.8kb restriction enzyme fragment encoding most of the coding sequence of the rat bone PTH/PTHrp receptor (Fig. 3). The nitrocellulose filters were incubated at  $42^\circ\text{C}$  for 4 hrs in a prehybridization solution containing 50% formamide, 4x saline sodium citrate (SSC;  $^1\text{x}$  SSC: 300 mM NaCl, 30 mM NaCitrate, pH 7.0), 2x Denhardt's solution, 10% Dextran sulphate, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  salmon sperm DNA (final concentration). The hybridizations were carried out in the same solution at  $42^\circ\text{C}$  for 18-24h. Filters were washed with 2x SSC/0.1% SDS for 30 minutes at room temperature and then with  $^1\text{x}$  SSC/0.1% SDS for 30 minutes at  $45^\circ\text{C}$ . The films were exposed at  $-80^\circ\text{C}$  for 18-24h using intensifying screens.

About 1,000,000 clones were screened from each library. Positive clones were plaque-purified and lambda phage DNA was isolated (Sambrook et al., *supra*). Cloned inserts were removed from phage DNA by digestion with restriction endonucleases HindIII and EcoRI (lambda GT10 library), or with XhoI and SstI (EMBL3 library), and were then subcloned into pcDNAI (Invitrogen, San Diego, CA) using the appropriate, dephosphorylated restriction sites. Sequencing of the CsCl<sub>2</sub>-purified subclones was performed according to Sanger et al. (Biochem 74:5463, 1977) by the dideoxy termination method (Sequenase version 2 sequencing kit, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH).

- 14 -

Reverse transcription and polymerase chain

reaction (PCR): 3 µg of poly (A)+ RNA from human kidney (Clontech, Palo Alto, CA) in 73.5 µl of H<sub>2</sub>O was incubated at 100°C for 30 seconds, quenched on ice, and then added 5 to 20 µl of 5x RT buffer (1x RT buffer: 40 mM Tris-HCl, pH 8.2, 40 mM KCl, 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, and dNTPs at 0.5 mM each), 2 µl (4 units) RNasin (Promega Biotec, Madison, WI), 1 µl (80 pmol/µl) of the human cDNA primer H12  
10 (5'-AGATGAGGCTGTGCAGGT-3'; SEQ ID NO.: 14) and 80 units of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Life Sciences, St. Petersburg, FL). The reaction mixture was incubated for 40 minutes at 42°C. One-tenth of the first strand synthesis reaction mixture was then amplified by 15 PCR in a final volume of 100 µl containing 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 µM dNTPs, 2 units of Vent polymerase (New England Biolab, Beverly, MA), and 2 µM each of the forward and the reverse primers (PCR conditions: denaturing for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 50°C, and extension at 20 72°C for 3 minutes; 40 cycles).

Two independent PCRs were performed using two different forward primers: i) degenerate primer RK-1 (5'-GGAATTCCATGGGAGCGGCCGGAT-3'; SEQ ID NO.: 15) based on  
25 G CC the 5' coding end of the two previously cloned PTH/PTHrP receptors (described above), and ii) primer RK-2 (5'-CGGGATCCCAGCGGCCCTAGGCGGT-3'; SEQ ID NO.: 16) based on the 5' untranslated region of the human genomic clone HPG1. Both PCR reactions used the reverse primer H26 (5'AGTATAGCGTCCTTGACGA-3'; SEQ ID NO.: 17) representing nucleotides 713 to 731 of the coding region of the human PTH/PTHrP receptor (Fig. 4). PCR products were blunt-ended using Klenow enzyme and cloned into 30 35 dephosphorylated pcDNAI cut with EcoRV.

- 15 -

Northern blot analysis: Total RNA was extracted from SaOS-2 cells and from human kidney by the guanidine thiocyanate method (Chirgwin et al., Biochem. 18:5294, 1979). For Northern blot analysis, ~10 µg of total RNA 5 was subjected to electrophoresis on a 1.5%/37% formaldehyde gel and blotted onto nitrocellulose filters (Schleicher and Schuell, Keene, NH). The hybridization conditions were the same as those for screening the phage libraries (see above). The filters were washed at a final 10 stringency of 0.5x SSC/0.1% SDS for 30 min at 60°C and exposed for autoradiography.

Southern blot analysis: Human genomic DNA was prepared using the SDS/proteinase K method (Gross-Bellard et al., Eur. J. Biochem. 36:32, 1973). For Southern 15 analysis, ~10 µg of DNA was digested with SstI, PvuII and XbaI; subjected to electrophoresis on a 0.8% agarose gel; and blotted onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Keene, NH). The hybridization conditions were the same as those for screening the phage libraries (see 20 above). The filters were washed at a final stringency of 0.5x SSC/0.1% SDS for 30 min at 55°C and exposed for autoradiography.

#### FUNCTIONAL ASSAYS

Tests to characterize the functional properties of 25 the cloned receptors expressed on COS cells included:

- 1) binding of PTH and PTHrP fragments and analogues, II) stimulation of cyclic AMP accumulation by PTH and PTHrP fragments and analogues,  
30 III) increase of intracellular free calcium by PTH and PTHrP fragments and analogues, and IV) activation of inositol phosphate metabolism by PTH and PTHrP fragments and analogues. The methodologies are as follows:

- 16 -

(26) Radioreceptor Assay

[Nle<sup>8</sup>,Nle<sup>18</sup>,Tyr<sup>34</sup>]bPTH-(1-34)amide (NlePTH), and [Tyr<sup>36</sup>]PTHrP(1-36)amide (PTHrP) were iodinated with Na<sup>125</sup>I (carrier free, New England Nuclear, Boston, MA) as previously reported (Segre et al., J. Biol. Chem. 254: 6980, 1979), and purified by reverse-phase HPLC. In brief, the labeled peptide was dissolved in 0.1% trifluoracetic acid (TFA), applied to a C<sub>18</sub> Sep-pak cartridge (Waters Associates, Inc., Milford, MA) and eluted with a solution of 60% acetonitrile in 0.1% TFA. After lyophilization, the radioligand then was applied to C<sub>18</sub>-μBondapak column (3.9 mm x 30 cm. Waters Associates) and eluted over 30 min with a linear gradient of 30-50% acetonitrile-0.1% TFA at a flow rate of 2 ml/min. The radioligand eluted in two peaks; the first peak, which eluted at approximately 38% acetonitrile, was used in these studies because it gave higher total and specific bindings. The specific activity was 500 ± 75 mCi/mg, which corresponds to an average iodine-peptide ratio of 20:1.

COS-7 cells were grown in 15 cm plates in DMEM, 10% heat-inactivated FBS, 10 mg/L gentamycin until 80-90% confluent. Twenty-four hours after transfection by the DEAE/Dextran method (Sambrook et al., *supra*), with 1-2 μg of plasmid DNA, the cells were trypsinized and replated in multiwell plastic dishes (16 or 35 mm diameter, Costar, Cambridge, MA) at a cell concentration of 5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>). Cell number increased only slightly after transfection. After continuing culture for another 48 h, radioreceptor assays were performed. The culture medium was replaced with buffer containing 50 mM Tris-HCL (pH 7.7), 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCL, 0.5% heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO), and 5% heat-inactivated horse

- 17 -

1 serum (KC Biological Inc., Lenexa, KS) immediately before  
studies were initiated. Unless otherwise indicated,  
studies were conducted with cells incubated in this  
buffer at 15°C for 4 h with  $4 \times 10^5$  cpm/ml ( $9.6 \times 10^{-11}$  M)  
5 of  $^{125}\text{I}$ -labeled NlePTH or PTHrP.

(2) 10 Incubations were terminated by aspirating the  
buffer, and repeatedly (x3) washing the culture dishes  
containing the adherent cells with chilled 0.9% NaCl  
solution, over a 15 sec period. Cell-bound radioactivity  
was recovered by the sequential addition (x3) of 1 N  
NaOH (200  $\mu\text{l}$ ) to each well. After 30 min at room  
temperature, the NaOH was transferred to a glass tube. A  
second and third extraction with 1 N NaOH (200  $\mu\text{l}$ ) were  
combined with the first, and the total radioactivity was  
15 counted in a  $\gamma$ -spectrometer (Packard Instruments, Downers  
Grove, IL). Tracer adherence to culture vessel without  
cells was negligible (<0.2% of total counts added), if  
vessels were preincubated with culture medium.

(3) 20 Determinations of cAMP accumulation  
Intracellular cAMP accumulation was measured as  
described previously (Abou-Samra et al., J. Biol. Chem.  
262:1129, 1986). Cells in 24-well plates were rinsed  
with culture medium containing 0.1% BSA and 2mM IBMX.  
The cells were then incubated with PTH or PTHrP for 15  
25 min. at 37° C. The supernatant was removed and the cells  
immediately frozen by placing the whole plate in dry ice  
powder. Intracellular cAMP was extracted by thawing the  
cells in 1ml of 50 mM HCl and analyzed by a specific  
radioimmunoassay using an anti-cAMP antibody (e.g.,  
30 Sigma, St. Louis, MO). A cAMP analog (2'-O-monosuccinyl-  
adenosine 3':5'-cyclic monophosphate tyrosyl methyl  
ester, obtained from Sigma) which was used a tracer for  
cAMP was iodinated by the chloramine T method. Free  
iodine was removed by adsorbing the iodinated cAMP analog  
35 onto a C18 Sep-pak cartridge (Waters, Milford, MA).

- 18 -

After washing with dH<sub>2</sub>O, the iodinated cAMP analog was eluted from the Sep-pak Cartridge with 40% acetonitrile (ACN) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The iodinated cAMP analog was lyophilized, reconstituted in 1 ml 0.1% TFA, and injected into a C18 reverse phase HPLC column (Waters). The column was equilibrated with 10% ACN in 0.1% TFA, and eluted with gradient of 10-30% ACN in 0.1% TFA. This allows separation of the mono-iodinated cAMP analog from the non-iodinated cAMP analog. The tracer is stable for up to 4 months when stored at -20° C. The standard used for the assay, adenosine 3':5'-cyclic monophosphate, was purchased from Sigma. Samples (1-10 µl of HCl extracts) or standards (0.04-100 fmol/tube) were diluted in 50 mM Na-acetate (pH 5.5), and acetylated with 10 µl of mixture of triethylamine and acetic anhydride (2:1 vol:vol). After acetylation, cAMP antiserum (100 µl) was added from a stock solution (1:4000) made in PBS (pH 7.4), 5 mM EDTA and 1% normal rabbit serum. The tracer was diluted in PBS (pH 7.4) with 0.1% BSA, and added (20,000 cpm/tube). The assay was incubated at 4° C overnight. The bound tracer was precipitated by adding 100 µl of goat anti-rabbit antiserum (1:20 in PBS) and 1 ml of 7% polyethyleneglycol (MW 5000-6000), centrifuging at 2000 rpm for 30 min. at 4° C. The supernatant was removed and the bound radioactivity was counted in a γ-counter (Micromedic). Standard curves were calculated using the four-parameter RIA program supplied by Micromedic. Typically, the assay sensitivity is 0.1 fmol/ tube, and the standard concentration that displaces 50% of tracer is 5 fmol/tube.

In an alternative method for assaying cAMP accumulation, COS cells transfected with PTH/PTHrP receptor cDNA are harvested with a plastic policeman into a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM

- 19 -

MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ethyleneglycolbis(β-amino ethyl ether) N,N'-tetra-acetic acid (EGTA) (Sigma) and 1 mM dithiothreitol (Sigma). Cells are homogenated by 20 strokes of tightly-fitting Dounce homogenizer, and centrifuged at 13,000 × g for 15 min at 4°C (Eppendorf, type 5412, Brinkmann Instruments, Inc., Westburg, NY). The pellet containing the plasma membranes is resuspended in the same buffer by several strokes with a Dounce homogenizer, and further diluted with the same buffer to a protein concentration of approximately 1.2 mg/ml, as determined by the method of Lowry et al. (Lowry et al., J. Biol. Chem. 193: 265, 1951). Approximately 30 µg (25 µl) membrane are incubated with varying concentrations of hormone or vehicle alone for 10 min at 37°C (final volume, 100 µl) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.8 mM ATP, 4 × 10<sup>6</sup> cpm [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP (New England Nuclear, Boston, MA), 9 mM theophylline, 4.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 26 mM KCl, 0.12% BSA, and an ATP-regenerating system containing 5 mM creatine phosphate (Schwartz/Mann Division, Becton-Dickenson & Co., Orangeburg, NY) and 0.1 mg/ml creatine phosphokinase (Shwartz/Mann). Incubations are initiated by addition of the membrane suspension and terminated by addition of 100 µl of a solution containing 20 mM cAMP, approximately 50,000 cpm [<sup>3</sup>H]cAMP, and 80 mM ATP. The reaction mixture is boiled, and the [<sup>32</sup>P]cAMP generated is purified by sequential chromatography on ion-exchange columns (Dowex 50 W-X4, Biorad Lab, Richmond, CA) and alumina (Sigma). The [<sup>32</sup>P]cAMP may be counted in a β-scintillation counter (Packard Instrument Co.), with correction for recovery of [<sup>3</sup>H]cAMP.

Determination of intracellular free calcium

Measurements of intracellular calcium levels in cells transfected with PTH/PTHRP receptor cDNAs were performed using Fura-2 AM (acetomethoxy ester of Fura-2,

- 20 -

Molecular Probes Inc., Eugene, OR) loaded cells. Details of the methodology are:

- Coverslips plated with COS cells were incubated in Fura-2 AM loading buffer containing, in mM: HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), 20; CaCl<sub>2</sub>, 1; KCl, 5; NaCl, 145; MgSO<sub>4</sub>, 0.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4; glucose, 10; and Fura-2 AM 91-(2-5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid acetomethoxy ester), 0.5; at 37°C at pH7.4, aerated with 95% air and 5% CO<sub>2</sub> for 45 minutes. Cells loaded with Fura-2 AM were then washed with a modified Krebs-Heinseleit (KH) buffer containing, in mM: HEPES, 20; CaCl<sub>2</sub>, 1; KCl, 5; NaCl, 145; MgSO<sub>4</sub>, 0.5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; glucose, 5; pH7.4. To check that cleavage of the ester occurred, the excitation spectra after different times of Fura-2 AM incubation were measured. At 5 min. after the start of incubation, the excitation spectrum peaked at approximately 360 nm, reflecting incomplete hydrolysis of Fura-2 AM, whereas beyond 30 min. the excitation spectrum peaked at 345 nm, characteristic of Fura-2.

- To measure fluorescence of individual cells, the cover slips were placed in a microscope tissue chamber (Biophysica Technologies, Inc., MD). The chamber consisted of a shallow, sloped compartment made of Teflon with a silicone rubber seal. The cover slips served as the bottom of the chamber. A heater/cooler ring was encased in the silicone rubber which sealed the coverslip in place. Temperatures were varied between 22°C and 37°C by applying 0-7.4 V to the heater. If the temperature is not specifically stated, the experiment was performed at 37°C. The chamber was mounted on the stage of an inverted microscope (Zeiss IM-35, Thornwood, NY). Fura-2 fluorescence was excited with a 75 watt Xenon arc lamp placed at the focal point of a condenser (Photon

- 21 -

Technologies International (PTI) Inc., NJ). Grating monochromators, alternated by a rotating chopper in which mirror vanes alternate with transmitting sectors, were used for selecting wavelengths. The monochromator outputs were combined to form a common optical path which exited the source housing through an adjustable iris. The light then passed through quartz lenses and a dichroic mirror through a 100x Nikon Fluor objective. A photon-counting PMT device detection was used to measure the light output. Data analysis was performed using PTI software run on an IBM-compatible AT/286 computer using the MS-DOS operating system. Data was retained and manipulated in a packed binary format.

Intracellular calcium concentrations were calculated according to the formula:  $[Ca^{2+}]_i = K_d(R - R_{min}) / (R_{max} - R)B$ , where R is the ratio of fluorescence of the cell at 340 and 380 nm; R<sub>max</sub> and R<sub>min</sub> represent the ratios of Fura-2 fluorescence intensity at 340 and 380 nm excitation wavelengths in the presence of a saturating amount of calcium and effectively zero calcium, respectively; B is the ratio of fluorescence of Fura-2 at 380 nm in zero calcium to that in saturating amounts of calcium; and K<sub>d</sub> is the dissociation constant of Fura-2 for calcium. To determine R<sub>max</sub>, at the end of an experiment ionomycin was added to the Fura-2 AM loaded cells to equilibrate Ca<sup>2+</sup> between the extracellular (1mM) and intracellular environments. To calculate R<sub>min</sub>, 1mM EGTA was then added to the bathing solution. Different dissociation constants were used at the different temperatures: 224 nM at 34-37°C and 135 nM at 24-27°C.

#### Determination of inositol phosphate

The level of inositol phosphate metabolism was determined in COS cells transfected with PTH/PTHrP

- 22 -

(23) receptors using previously published methods (Bonventre, et al., J. Biol. Chem. 265: 4934, 1990).

cont

## RESULTS

### Molecular characterization

(24) 5 Two independent clones (OK-H and OK-O), both of which were isolated from the OK cell cDNA library, had lengths of approximately 2 kilobases. The determined nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of these clones are shown in Figs. 1 (SEQ ID NO.:1) and 2  
10 10 (SEQ ID NO.:2) respectively. The R15B clone isolated from the ROS cell cDNA library had a length of approximately 4 kilobases. The determined nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the rat bone PTH/PTHrP receptor is depicted in Fig. 3 (SEQ ID  
15 15 NO.:3).

(25) 20 The three cDNA clones appear to be full-length by the criteria of having codons encoding methionine residues that are predicted to be the likely candidates as initiator methionines. These methionine codons are followed by amino acid sequences (deduced from the DNA) with properties suggesting that they are "signal-peptide" sequences. All three receptor cDNAs have stop codons at locations that permit these receptors to "fit" a putative seven-membrane spanning model, a model typical for G-  
25 protein-linked receptors. Most importantly, all three cloned receptors bind ligands and, when activated, are capable of activating intracellular effectors. These properties suggest that all three of the isolated clones encode full-length cDNAs.

(26) 30 Fig. 4 demonstrates the high degree of homology between the amino acid sequences encoded by the cDNAs from OK-O and ROS 15B. There is an overall 87% homology and a 77.8% amino acid identity between these two receptors. This high level of identity over long

- 23 -

(26) 5 stretches of amino acids demonstrates that the amino acid sequence of the PTH receptor is evolutionarily conserved to a high degree. This allows the data from both OK-O and R15B to be extrapolated to other species, including human.

(27) 10 Fig. 5 shows the deduced amino acid sequences of all three cloned cDNAs lined up according to sequence homology. The OK-H sequence is identical to OK-O except in the C-terminus tail, where the OK-O sequence totals 585 amino acids whereas the OK-H sequence stops at 515 amino acids. This difference is attributable to a single nucleotide (G) deleted in the OK-H sequence compared to the OK-O sequence, causing a frame shift and early stop codon in the former. It is not known whether OK-O and 15 OK-H represent the products of two separate genes or of a laboratory artifact.

(28) 20 Some G-protein-coupled receptors are encoded by intronless genes (Kobilka et al., Nature 329:75, 1987); Kobilka et al., J. Biol. Chem. 262:7321, 1987; Heckert et al., Mol. Endocrinol. 6:70, 1992; Kobilka et al., Science 238:650, 1987; Bonner et al., Science 237:527, 1987; Sunahara et al., Nature 347:80, 1990). To isolate a 25 human PTH/PTHrP receptor cDNA, both a human cDNA library and a human genomic library were screened with a probe (BamHI/NotI) representing most of the coding region of the rat bone PTH/PTHrP receptor (Fig. 3). Screening the human kidney cDNA library led to the isolation of the clone HK-1 (Fig. 6) [SEQ ID NO.: 6]. Since one of the two EcoRI cloning sites of lambda GT10 proved to be 30 eliminated as a result of the library construction, the HindIII/EcoRI phage fragment containing the cDNA insert and ~250 bp of the 37 kb (left) lambda arm was subcloned into the corresponding restriction sites in pcDNAI. DNA sequencing revealed that the cloned cDNA contained ~1000 35 bp of the 3' coding region and ~200 bp of the 3' non-

- 24 -

(32) coding region including an A-rich 3' end. The coding region 5' to the XhoI site was subsequently used to re-screen the library and led to the isolation of the clone HK-2 which, after subcloning into pcDNAI, proved to 5 contain ~1400 bp of the coding region. For the third screening of the library, the Pvull/PstI fragment of HK-2 was used; the isolated clone HK-3 proved to be identical to HK-2.

(33) The genomic library screening (~10<sup>6</sup> pfu) resulted 10 in the isolation of four independent clones. Comparison of Southern blot analyses of restriction enzyme digests of these clones with that of normal genomic DNA, revealed that one 15 kb genomic clone, HPG1 (also referred to as HG4A), contained a SstI/SstI fragment that had the same 15 size as one hybridizing DNA species from normal human genomic DNA digested with SstI (see below). The hybridizing 2.3 kb SstI/SstI DNA fragment and an ~8 kb XhoI fragment which comprised the SstI/SstI fragment were both subcloned into pcDNAI. Further Southern blot 20 analysis of the SstI/SstI DNA fragment revealed that an ~1000 bp BamHI/SstI fragment encoded a portion of the human PTH/PTHrP receptor which later proved to represent the exon encoding the putative signal peptide and the 5' non-translated region which is interrupted by an ~1000 bp 25 intron (Fig. 7).

(34) To isolate the remaining ~450 nucleotides of the 30 coding region, poly (A)+ RNA from human kidney was reverse transcribed after priming with H12 (Fig. 7). After single strand synthesis, two independent PCRs were performed using two different forward primers: i) a degenerate primer RK-1 based on the 5' coding end of the two previously cloned PTH/PTHrP receptors, OK-O and R15B; and ii) primer RK-2 based on the 5' non-coding region of HPG1. H-26 was used as the reverse primer for both 35 reactions. Southern blot and restriction map analyses

- 25 -

confirmed the expected size of the amplified DNA encoding the human PTH/PTHrP receptor. The blunt-ended PCR products encoding the 5' end of the human PTH/PTHrP were cloned into pcDNAI using the dephosphorylated EcoRV sites. Sequence analysis of each PCR clone confirmed their 5' nucleotide difference due to the difference in forward primer sequence, but revealed otherwise identical sequences. Nucleotide sequencing of both strands of the human PTH/PTHrP receptor cDNA revealed an open reading frame encoding a 593-amino acid protein (Fig. 6, SEQ ID NO.:4).

The full-length human kidney PTH/PTHrP receptor cDNA, HKrk, was constructed using the BamHI/PvuII fragment of PCR clone #2 and HK-2. Using the full-length cDNA encoding the human PTH/PTHrP receptor, Northern blot analysis of total RNA (~10 µg/lane) from human kidney and SaOS-2 cells revealed one major hybridizing DNA species of ~2.5 kb (Fig. 19). The XhoI digest of normal human genomic DNA, when probed with the same full-length cDNA (Fig. 20), revealed one major hybridizing species of about 5.5 kb, and two DNA species of 4 and 8 kb which weakly hybridized. These data suggest that the human PTH/PTHrP receptor is the product of a single gene. This full-length clone was then transiently expressed in COS-7 cells for functional and biological characterization by the methods cited above.

Comparison of the human receptor with the opossum kidney PTH/PTHrP receptor and the rat bone PTH/PTHrP receptor, revealed 81% and 91% amino acid sequence identity, respectively, and consequently a very similar hydrophobicity plot (Fig. 8). All extracellular cysteines including the two cysteine residues in the presumed signal peptide are conserved, as are all potential, extracellular

- 26 -

26 | N-glycosylation sites. A number of the amino acids which  
were not identical between the human kidney and rat bone  
PTH/PTH<sub>r</sub> receptors were found to be conserved between the  
human and the opossum receptors. These conserved amino  
5 | acids include an Arg to Leu at 51, an Arg to Trp at 58,  
an Arg to His at 262, an Asp to His at 358, an Ile to Thr  
at 422, and a Thr to Leu at 427.

Biological Characterization

10 | Functional characterization of the biological  
properties of the opossum and rat PTH/PTH<sub>rP</sub> receptors was  
performed in transiently transfected COS cells by a  
radioreceptor assay technique using both <sup>125</sup>I-PTH<sub>rP</sub> and  
<sup>125</sup>I-NlePTH as radioligands, and by bioassays that measure  
15 | ligand-stimulated cAMP accumulation, increase in  
intracellular free calcium, and stimulation of inositol  
phosphate metabolism, by the methods cited above.

37 | Fig. 9 demonstrates that COS cells expressing OK-  
H bind <sup>125</sup>I-PTH<sub>rP</sub>. These data also demonstrate that  
binding of PTH<sub>rP</sub> is inhibited when intact PTH (1-34) or  
20 | PTH analogues which are shortened at their amino terminus  
(i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle  
substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a  
tyrosine substitution for phenylalanine at position 34)  
are used as competitors for binding. Similarly, binding  
25 | of <sup>125</sup>I-NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited  
when PTH<sub>rP</sub> or PTH<sub>rP</sub> fragments were used as competitors.  
These data indicate that PTH and PTH<sub>rP</sub> both bind to the  
receptor encoded by OK-H.

30 | Fig. 10 demonstrates that COS cells expressing OK-  
H increase their concentration of intracellular free  
calcium when exposed to NlePTH, but to a smaller extent  
(mean =  
39 nm), or not at all, when compared to COS cells  
expressing OK-O or R15B receptors (Fig. 12 and Fig. 14)  
35 | and stimulated with NlePTH. Unlike COS cells expressing

- 27 -

OK-O or R15B, COS cells expressing OK-H do not show a detectable increase in metabolism of inositol phosphate when stimulated with NlePTH (Fig. 15).

Fig. 11 demonstrates that COS cells expressing OK-O bind  $^{125}\text{I}$ -PTHrP. These data also demonstrate that binding of PTHrP is inhibited when intact PTH (1-34) or PTH analogues which are shortened at their amino terminus (i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a tyrosine substitution for phenylalanine at position 34) are used as competitors for binding. Similarly, binding of  $^{125}\text{I}$ -NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited when PTHrP or PTHrP fragments were used as competitors. These data indicate that PTH and PTHrP both bind to the receptor encoded by OK-O.

Fig. 12 demonstrates that COS cells expressing OK-O increase their concentration of intracellular free calcium and their rate of inositol phosphate metabolism after stimulation with NlePTH and PTHrP (Fig. 15).

Fig. 13 demonstrates that COS cells expressing R15B bind  $^{125}\text{I}$ -PTHrP. These data also demonstrate that binding of PTHrP is inhibited when intact PTH (1-34) or PTH analogues which are shortened at their amino terminus (i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a tyrosine substitution for phenylalanine at position 34) are used as competitors for binding. Similarly, binding of  $^{125}\text{I}$ -NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited when PTHrP or PTHrP fragments were used as competitors. These data indicate that PTH and PTHrP both bind to the receptor encoded by R15B.

Fig. 14 demonstrates that COS cells expressing R15B increase their concentration of intracellular calcium to an extent similar to stimulated COS cells expressing OK-O.

- 28 -

Fig. 15 demonstrates that COS cells expressing R15B or OK-O increase their rate of phosphatidyl inositol hydrolysis, as evidenced by the rapid increase in inositol trisphosphate ( $IP_3$ ) and inositol bisphosphate ( $IP_2$ ) accumulation after stimulation of the cells with NlePTH or PTHrP. Conversely, COS cells expressing OK-H did not show any detectable increase in inositol trisphosphate and inositol bisphosphate accumulation after stimulation with NlePTH or PTHrP. These data suggest that the PTH receptor encoded by R15B and OK-O is coupled to phospholipase C, presumably through  $G_p$ . Since the only difference between OK-O and OK-H is in the cytoplasmic C-terminal tail, these data strongly suggest that the C-terminus of the PTH receptor encoded by OK-O and R15B is involved in the activation of phospholipase C.

Fig. 16 demonstrates that COS cells expressing R15B and OK-H increase cAMP accumulation after stimulation with NlePTH. Similar results were obtained in COS cells expressing OK-O. No cAMP stimulation was detected in COS cells transfected with the cDM8 vector alone. These data suggest that PTH receptor coupling to adenylate cyclase does not require the full length C-terminal cytoplasmic tail of the receptor.

These data demonstrate that all three PTH/PTHrP receptors cloned from both OK and ROS cell cDNA libraries bind the amino-terminal ligands of both peptides equivalently. Activation of all these receptors by ligand stimulates adenylate cyclase (as measured by increased intracellular cAMP), presumably through activation of one class of guanine nucleotide binding proteins (G-proteins). G-proteins have a trimeric peptide structure in which one of the subunits, alpha, is distinct, and the other two, beta and gamma, are identical or highly homologous. One of these G-proteins

- 29 -

(G<sub>s</sub>) contains G-alpha-"stimulatory" (G-alpha-s) which is involved in the activation of adenylate cyclase.

Binding of ligand to OK-O and R15B, but not to OK-H, also increases intracellular free calcium and stimulates metabolism of inositol phosphate. These properties strongly suggest that activation of both OK-O and R15B receptors by ligand results in stimulation of a second intracellular effector, phospholipase C. The coupling mechanism between these activated receptors and phospholipase C is likely to be a G-protein which is distinct from G<sub>s</sub>. In contrast, the properties of the activated OK-H receptor which is truncated at the carboxy terminus, suggest that it may not activate phospholipase C, or that it activates phospholipase C inefficiently.

The biochemical role of the carboxy-terminal tail of the PTH/PTHrP receptor was further investigated by the construction of a carboxy-terminally-truncated rat receptor, R480, by standard PCR technology using R15B as a template and an upstream primer containing a stop codon inserted at position 481. Briefly, the upstream primer was a synthetic oligonucleotide based on nucleotides 1494-1513 of the rat cDNA sequence (see Fig. 3; SEQ ID NO.: 3) to which a stop codon and an XbaI cloning site were added. Thirty PCR cycles were carried out, each cycle consisting of 1 min at 92°C for denaturation, 1 min at 60°C for annealing, and 1 min at 72°C for extension. The product was cut with NsiI and XbaI and purified by gel electrophoresis. R15B was sequentially digested with XbaI and NsiI, and the purified PCR product was then ligated into the XbaI-NsiI cut R15B vector. The resulting plasmid, R480, was amplified in bacteria and sequenced.

R480 encodes 480 amino acids that are identical to those in the 591 amino acids receptor. This truncated cDNA was expressed in COS-7 cells (transient expression)

- 30 -

and in CHO cells (stable expression). Both COS-7 and CHO cells expressing the truncated receptor, R480, and the wild type receptor, RB, bind PTH(1-34) with equivalent affinities. When activated, R480 stimulates cAMP 5 accumulation in COS7 and CHO cells as efficiently as does the wild type receptor. In contrast to the wild type receptor, R480 did not mediate any increase in  $[Ca^{2+}]_i$  when stimulated by PTH in either the COS-7 cells or the CHO cells. These data indicate that the molecular 10 requirements for activation of phospholipase C and adenylate cyclase by PTH/PTHrP receptor are distinct from each other, and point to a major role of the carboxy-terminal tail of the PTH/PTHrP receptor in coupling to phospholipase C but not to adenylate cyclase. Of course, 15 it is also possible that activated PTH/PTHrP receptors may activate additional G-proteins and/or intracellular effector molecules.

Analysis of COS-7 cells transfected with the cloned human PTH/PTHrP receptor demonstrated that 20 radiolabelled PTH(1-34) and PTHrP(1-36) (~200,000 cpm) bound to the expressed receptors with similar efficiency (specific binding:  $10.1 \pm 3.7\%$  and  $7.6 \pm 6.0\%$ , respectively) to that observed for COS-7 cells expressing R15B (specific binding:  $8.1 \pm 3.5\%$  and  $7.1 \pm 4.1\%$ , respectively). The expressed human PTH/PTHrP receptors bound PTH(1-34) with 2-fold higher apparent Kd than did the rat bone PTH/PTHrP receptor: ~5 nM versus ~10 nM 25 (Fig. 17). However, despite their high degree of amino acid homology, the two receptors showed significant differences in affinity for PTH(3-34) and PTH(7-34). PTHrP(1-36) displayed a 2- to 4-fold lower affinity for the human PTH/PTHrP receptor than for the rat receptor (~35 nM for HKrk versus ~10 nM for R15B) which appeared more pronounced when PTHrP(1-36) was used as radioligand. 30 The affinities for PTH(3-34) and PTH(7-34) were 7- and 35

- 31 -

35-fold higher with the expressed HKrK than with R15B (~7 nM versus ~45 nM for PTH(3-34), respectively; ~60 nM versus ~2000 nM for PTH(7-34), respectively). In COS-7 cells expressing either receptor, both PTH(1-34) and 5 PTHrP(1-36) stimulated the increase in intracellular free calcium and cAMP accumulation to the same extent (Fig. 18).

Relationship of PTH/PTHrP receptors

The amino acid sequence of the human PTH/PTHrP receptor displays a very high degree of conservation compared to the bone PTH/PTHrP receptor from rat, a eutherian mammal, while its sequence identity with the PTH/PTHrP receptor with the opossum, a marsupial mammal, is less marked. Like the opossum kidney and the rat bone receptor, the human kidney receptor induces an increase 10 in both intra-cellular cAMP and intracellular free calcium when challenged with either PTH or PTHrP. Despite the high degree of homology between the human PTH/PTHrP receptor and the opossum and rat homologs, the 15 transientsly expressed human receptor has some functional characteristics that are distinct from those of the rat bone receptor. These include a slightly higher affinity for PTH(1-34) and a significantly decreased affinity for PTHrP(1-36). Higher affinities were observed for PTH(3- 20 34) and in particular for PTH(7-34), the affinity of which for the human receptor was about 35-fold higher in comparison to the rat bone receptor. These findings may have significant implications for the future development 25 of PTH/PTHrP analogues, since they predict that species-specific tissues would be the appropriate tissues for testing the potency of antagonists (and agonists) *in vitro*.

Relationship of PTH/PTHrP receptors to other receptors

The biochemical properties of PTH and PTHrP 30 receptors suggest that they are members of the class of 35

- 32 -

membrane receptor molecules known as G-protein-linked membrane receptors. The structural features of well-characterized G-protein receptors indicate that they all have at least seven regions of several consecutive 5 hydrophobic amino acids, each of which regions is of sufficient length to span the plasma membrane.

One subfamily of G-protein-linked membrane receptors, termed the glycopeptide receptor subfamily, includes receptors that bind and are activated by 10 glycopeptide hormones (thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and chorionic gonadotropin). All of these receptors are characterized by (1) extensive putative amino-terminal extracellular domains (greater than 300 amino acids) that 15 are thought to contain some or all of the ligand-binding domains, and (2) considerable amino-acid homology, particularly in the seven putative transmembrane domains. A second subfamily, termed the adrenergic/muscarinic 20 subfamily, includes receptors that are activated by small ligands, such as the catecholoamines, neuromuscular transmitters, and retinol. These receptors are all characterized by relatively short (25-75 amino acids) 25 putative amino-terminal extracellular domains, as well as considerable amino acid homology, particularly in the seven putative transmembrane domains. Activation of these receptors by their ligands appears to involve at least several of the multiple transmembrane domains, and does not appear to involve the amino-terminal portion of the receptors.

30 Several structural characteristics which can be deduced from the predicted amino acid sequence of the rat PTH/PTHrP receptor (Fig. 3) indicate that the PTH/PTHrP is a G-protein-linked receptor. The amino terminus shows characteristic features of a signal peptide, including a 35 hydrophobic domain and the presence of three consecutive

- 33 -

leucine residues. This amino acid stretch of 20-28 amino acids may serve as a leader sequence, similar to the amino terminus preceding the extracellular domains of other glycoprotein receptors. There is also a cluster of 5 seven hydrophobic segments which represent putative membrane-spanning domains (Fig. 19).

The predicted amino acid sequences of the opossum kidney, rat bone and human kidney PTH/PTHrP receptors indicate that they do not fit comfortably into either of 10 these G-protein linked receptor subfamilies. Overall homology of the rat and human PTH/PTHrP receptors with the glycopeptide receptor and adrenergic/muscarinic subfamilies is approximately 10 to 20%, with a somewhat higher degree of homology within the transmembrane 15 domains. The latter is to be expected because of the limited menu of hydrophobic amino acids that could occur in those regions. Twenty percent homology is far less than that found among the receptors generally accepted to be members of each of these subfamilies. Additionally, 20 there are no portions of these sequences that have what could be characterized as intense homology (i.e., exactly matching amino acid sequences), even over limited regions.

Recent comparison with the newly characterized 25 secretin and calcitonin receptors (Ishihara et al., EMBO J 10:1635, 1991; Lin et al., Science 254:1022, 1991) has revealed between 30 and 40% identity between these receptors and the PTH/PTHrP receptor. Although the 30 PTH/PTHrP receptor is more than 100 amino acids longer than the calcitonin receptor, there is an ~32% identify between the amino acid sequences of the opossum kidney PTH/PTHrP receptor (SEQ ID NO NO.:2) and porcine kidney calcitonin receptor (GenBank accession no. M74420). A stretch of 17 out of 18 amino acids in the putative 35 transmembrane domain VII are identical. Also, two out of

- 34 -

four N-linked glycosylation sites and the position of seven out of eight potentially extracellular cysteines are conserved. Major differences between the two receptors appear to lie in their NH<sub>2</sub>-terminal and COOH-terminal domains. Comparison of amino acid sequences of the rat secretin receptor (GenBank accession no. X59132) and the human PTH/PTHrP receptor indicates that there is a 43% identity between these two receptors, with a stretch of 21 out of 25 amino acids of the putative transmembrane domain VII being identical. The similarity between the PTH/PTHrP, calcitonin and secretin receptors suggests that they represent a new family of seven transmembrane-spanning G protein-coupled receptors that activate adenylyl cyclase. Given the amino acid sequences of these receptors, those skilled in the art would be able to compare these sequences for regions of identity which would be useful in the design of nucleic acid probes which could then be used for the identification and isolation of other receptors which would belong to this family.

Deposit of Clones

Under the terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure, the CDNA expression plasmids R15B, OK-O, and OK-H; the phage HPG1; and a plasmid (termed 8A6) containing part of the human clone have been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), where they bear the respective accession numbers ATCC No. 68571, 68572, 68573, 40998 and 68570. Applicants' assignee, The General Hospital Corporation, represents that the ATCC is a depository affording permanence of the deposits and ready accessibility thereto by the public if a patent is granted. All restrictions on the availability to the

- 35 -

public of the material so deposited will be irrevocably removed upon the granting of a patent. The material will be available during the pendency of the patent application to one determined by the Commissioner to be 5 entitled thereto under 37 CFR 1.14 and 35 U.S.C. 122. The deposited material will be maintained with all the care necessary to keep it viable and uncontaminated for a period of at least five years after the most recent request for the furnishing of a sample of the deposited 10 plasmid, and in any case, for a period of at least thirty (30) years after the date of deposit or for the enforceable life of the patent, whichever period is longer. Applicants' assignee acknowledges its responsibility to replace the deposits should the 15 depository be unable to furnish a sample when requested due to the condition of the deposit.

POLYPEPTIDES

Polypeptides according to the invention include the opossum and rat and human parathyroid hormone 20 receptors as shown in Figs. 1-3 and 6, respectively, and any other naturally-occurring receptor which can be produced by methods analogous to those used to clone and express these receptors, or by methods utilizing as a probe all or part of one of the sequences described 25 herein. In addition, any analog or fragment of a PTH receptor capable of binding to a parathyroid hormone or a parathyroid hormone-related protein is within the invention.

Specific receptor analogs of interest include 30 full-length or partial receptor proteins having an amino acid sequence which differs only by conservative amino acid substitutions: for example, substitution of one amino acid for another of the same class (e.g., valine for glycine; arginine for lysine, etc.), or by one or 35 more non-conservative amino-acid substitutions,

- 36 -

deletions, or insertions located at positions which do not destroy the receptor's ability to bind to parathyroid hormone or parathyroid hormone-related protein.

- Specific receptor fragments of particular interest 5 include, but are not limited to, portions of the receptor deduced to be extracellular from the primary amino acid sequence, using a hydrophobicity/hydrophilicity calculation such as the Chou-Fasman method (see, e.g., Chou and Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47:251, 1978).
- 10 Hydrophilic domains, particularly ones surrounded by hydrophobic stretches (e.g., transmembrane domains) of at least 10 amino acids, present themselves as strong candidates for extracellular domains. Fig. 21 illustrates a predicted arrangement of extracellular, 15 intracellular, and transmembrane domains of one PTH receptor.

Examples of specific PTH receptor fragments include those with the following amino acid sequences (shown as standard single-letter symbols), derived from 20 the deduced amino acid sequence of the R15B clone:

Extracellular domains:

- RP-1: TNETREREVFDRGLGMIYTVG (SEQ ID NO.: 5)  
RP-2: VLYSGFTLDEAERLTEEEL (SEQ ID NO.: 6)  
RP-3: VTFFFLYFLATNYYWILVEG (SEQ ID NO.: 7)  
25 RP-4: Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP (SEQ ID NO.: 8)  
RP-5: PYTEVSGTLWQIQMHYEM (SEQ ID NO.: 9)  
RP-6: DDVFTKEEQIFLLHRAQA (SEQ ID NO.: 10)

Intracellular domains:

- RPi-7: FRRRLHCTRNY (SEQ ID NO.: 11)  
30 RPi-8: EKKYLWGFTL (SEQ ID NO.: 12)  
RPi-9: VLATKLRETNAGRCDTRQQYRKLLK (SEQ ID NO.: 13)

These fragments were synthesized and purified by HPLC according to the method of Keutmann et al., (Endocrinology 117: 1230, 1984).

EXPRESSION OF POLYPEPTIDES

(5) | Polypeptides according to the invention may be produced by expression from a recombinant nucleic acid having a sequence encoding part or all of a cell receptor 5 of the invention, using any appropriate expression system: e.g., transformation of a suitable host cell (either prokaryotic or eukaryotic) with the recombinant nucleic acid in a suitable expression vehicle (e.g., pcDNAI). The precise host cell used is not critical to 10 the invention; however, in the case wherein the polypeptides of the invention include all or part of the PTH/PTHrP receptor, the following host cells are preferred: COS cells, LLC-PK1 cells, OK cells, AtT20 cells, and CHO cells. The method of transfection and the 15 choice of expression vehicle will depend on the host system selected. Mammalian cell transfection methods are described, e.g., in Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989); expression vehicles may be chosen from those discussed, 20 e.g., in Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P.H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987). Stably transfected cells are produced via integration of receptor DNA into the host cell chromosomes. Suitable DNAs are inserted into pcDNA, pcDNAI-Neo, or another suitable plasmid, and 25 then cells are transfected with this plasmid with or without cotransfection with pSV-2-Neo, or pSV-2-DHFR by standard electroporation, calcium phosphate, and/or DEAE/Dextran techniques. Selection of transfected cells is performed using progressively increasing levels of 30 G418 (Geneticin, GIBCO), and if necessary, methotrexate.

(5) | DNA sequences encoding the polypeptides of the invention can also be expressed in a prokaryotic host cell. DNA encoding a cell receptor or receptor fragment is carried on a vector operably linked to control signals 35 capable of effecting expression in the prokaryotic host.

- 38 -

If desired, the coding sequence may contain, at its 5' end, a sequence encoding any of the known signal sequences capable of effecting secretion of the expressed protein into the periplasmic space of the host cell,

5 thereby facilitating recovery of the protein and subsequent purification. Prokaryotes most frequently used are various strains of E. coli; however, other microbial strains may also be used. Plasmid vectors are used which contain replication origins, selectable

10 markers, and control sequences derived from a species compatible with the microbial host. For example, E. coli may be transformed using derivatives of pBR322, a plasmid constructed by Bolivar et al. (Gene 2: 95, 1977) using fragments derived from three naturally-occurring

15 plasmids, two isolated from species of Salmonella, and one isolated from E. coli. pBR322 contains genes from ampicillin and tetracycline resistance, and thus provides multiple selectable markers which can be either retained or destroyed in constructing the desired expression

20 vector. Commonly used prokaryotic control sequences (also referred to as "regulatory elements") are defined herein to include promoters for transcription initiation, optionally with an operator, along with ribosome binding site sequences. Promoters commonly used to direct

25 protein expression include the beta-lactamase (penicillinase), the lactose (lac) (Chang et al., Nature 198: 1056, 1977) and the tryptophan (Trp) promoter systems (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980) as well as the lambda-derived P<sub>L</sub> promoter and N-gene

30 ribosome binding site (Simatake et al., Nature 292:128, 1981).

The nature of the cell receptor proteins of the invention is such that, upon expression within a cell, it is moved to the cellular membrane and partially through

35 the membrane, so that part of it remains embedded in the

- 39 -

membrane, part extends outside the cell, and part remains within the cell. Transformed cells bearing such embedded cell receptors may themselves be employed in the methods of the invention, or the receptor protein may be  
5 extracted from the membranes and purified.

Expression of peptide fragments lacking the hydrophobic portions of the protein responsible for anchoring the intact protein in the cellular membrane would not be expected to become embedded in the membrane;  
10 whether they remain within the cell or are secreted into the extracellular medium depends upon whether or not a mechanism promoting secretion (e.g., a signal peptide) is included. If secreted, the polypeptide of the invention can be harvested from the medium; if not, the cells must  
15 be broken open and the desired polypeptide isolated from the entire contents of the cells. Specific examples of polypeptides which might be expressed include, without limitation:

- 1) Amino-terminal portion comprising amino acids 20 1-192, including the putative leader sequence, of the rat bone PTH/PTHrP receptor as shown in Fig. 3.
- 2) Amino-terminal portion comprising amino acids 27-192, excluding the putative leader sequence, of the rat bone PTH/PTHrP receptor as shown in Fig. 3.
- 25 3) The full-length PTH/PTHrP receptor from rat bone, as shown in Fig 3.
- 4) RP-1 (as described above).
- 5) RP-2 (as described above).

The polypeptide of the invention can be readily 30 purified using affinity chromatography. Antibodies to these polypeptides, or the receptor specific ligands, (e.g., the hormones PTH and PTHrP for the PTH/PTHrP receptor) may be covalently coupled to a solid phase support such as Sepharose 4 CNBr-activated sepharose  
35 (Pharmacia), and used to separate the polypeptide of the

- 40 -

invention from any contaminating substances. Typically 1 mg of ligand or antibody will be incubated with CNBr-activated sepharose at 4°C for 17-20 h (with shaking). The sepharose is rinsed with 1 M Tris HCl (pH8) to block 5 excess active sites. The sepharose-PTH, sepharose-PTHrP, or sepharose-antibody is then incubated with the crude polypeptide in phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 4°C for 2 h (with shaking). The sepharose is then typically packed in a column, thoroughly washed with PBS (typically 10 10 times the column volume), and eluted with dilute HCl in H<sub>2</sub>O (pH 1.85). The eluate may then be concentrated by lyophylization and its purity checked, for example, by reverse phase HPLC.

#### ANTI-CELL RECEPTOR ANTIBODIES

15 Cell receptor or receptor fragments of the invention may be used to generate antibodies by any conventional method well known to those skilled in the art, including those which generate polyclonal antibodies and those which generate monoclonal antibodies. For 20 example, the deduced amino acid sequence of the PTH receptor reveals a protein structure that appears to have several transmembrane (i.e., hydrophobic) domains interspersed with presumably extracellular and intracellular regions (see Fig. 21) analogous to those 25 found in other G protein-linked receptors. This information can be used to guide the selection of regions of the receptor protein which would be likely to be exposed on the cell surface, and thus would be presented to antibodies in vivo. A short peptide representing one 30 or more of such regions may be synthesized (e.g., chemically or by recombinant DNA techniques) and used to immunize an animal (e.g., a rabbit or a mouse) to generate polyclonal or monoclonal antibodies. For example, certain of the peptides of the PTH/PTHrP 35 receptor listed above (RP-1, RP-5 and RP-6) have been

- 41 -

chemically synthesized using standard techniques and used to generate polyclonal antibodies in rabbits by the following procedure:

A preparation of a given peptide emulsified with 5 complete Freund's Adjuvant is injected intradermally into rabbits. Booster injections are emulsified in or complete adjuvant and injected at monthly intervals.

Antibody titer is assessed using either of two methods. First, serial dilutions of the antiserum in 1% 10 normal rabbit serum are incubated with  $^{125}\text{I}$ -labelled PTH/PTHrP receptor fragment by standard methods (e.g., see Segre et al., supra) for 24 h at 4° C. The bound  $^{125}\text{I}$ -PTH/PTHrP receptor fragments are separated from unbound by addition of 100  $\mu\text{l}$  of second antibody (anti- 15 rabbit IgG, Sigma) diluted 1:20 and 1 ml of 5% polyethylene glycol, followed by centrifugation at 2000 rpm for 30 min. at 4° C. The supernatant is removed and the pellet analyzed for radioactivity in a  $\gamma$ -counter. In the second method, cell lines expressing either native 20 (e.g., ROS 17/2.8, OK, SaOS-02 cells) or recombinant (COS cells or CHO cells transfected with R15B, OK-O or OK-H) PTH/PTHrP receptors are incubated with serially diluted antibody at 4° C, 20° C or 37° C for 1- 4 h. The cells are rinsed with PBS (x3) and incubated 25 for 2 h at 4° C with  $^{125}\text{I}$ -labelled (NEN, Dupont) or FITC-labelled (Sigma) second antibodies. After rinsing (x3 with PBS), the cells were either lysed with 0.1 M NaOH and counted in  $\gamma$ -counter (if  $^{125}\text{I}$ -labelled second antibody was used) or fixed with 1% paraformaldehyde and examined 30 by fluorescent microscopy (if FITC-labelled second antibody was used).

Another method for producing antibodies utilizes as antigen the intact cell receptor protein of the invention expressed on the surface of cells (e.g., 35 mammalian cells, such as COS cells, transfected with DNA

- 42 -

encoding the receptor). Such cells are prepared by standard techniques, e.g., by the DEAE-dextran transfection method, using a vector encoding and capable of directing high-level expression of the cell receptor.

- 5 Such cells may be used to generate polyclonal or monoclonal antibodies. For example, monoclonal antibodies specific for the PTH/PTHrP receptor may be produced by the following procedure:

Intact COS cells expressing high levels of rat  
10 recombinant PTH receptors on the cell surface are injected intraperitoneally (IP) into Balb-c mice (Charles River Laboratories, Willmington, MA). The mice are boosted every 4 weeks by IP injection, and are hyperimmunized by an intravenous (IV) booster 3 days  
15 before fusion. Spleen cells from the mice are isolated and are fused by standard methods to myeloma cells. Hybridomas are selected in standard hypoxanthine/aminopterin/thymine (HAT) medium, according to standard methods. Hybridomas secreting antibodies  
20 which recognize the PTH receptor are initially identified by screening with cell lines which naturally express abundant copies of the PTH-receptor per cell (such as ROS17/2.8 or OK cells), using standard immunological techniques. Those hybridomas which produce antibodies  
25 capable of binding to the PTH receptor are cultured and subcloned. Secondary screening with radioreceptor and cAMP stimulation assays can then be performed to further characterize the monoclonal antibodies (see below).

SCREENING FOR PTH RECEPTOR ANTAGONISTS AND AGONISTS

- 30 The polypeptides and antibodies of the invention and other compounds may be screened for PTH-competition and for antagonistic or agonistic properties using the assays described herein.

In one example, those antibodies that recognize  
35 the PTH receptor on the intact cells are screened for

- 43 -

their ability to compete with PTH or PTHrP for binding to a PTH/PTHrP receptor. Cells expressing PTH receptor on the cell surface are incubated with the  $^{125}\text{I}$ -PTH analog,  $^{125}\text{I}$ -NlePTH or  $^{125}\text{I}$ -PTHrP in the presence or absence of 5 the polyclonal or monoclonal antibody to be tested, for 4 h at 15°C. The antibody used may be from crude antiserum, cell medium, or ascites, or in purified form. After incubation, the cells are rinsed with binding buffer (e.g., physiological saline), lysed, and 10 quantitatively analyzed for radioactivity using a gamma-counter. Antibodies that reduce binding of the PTH analog to the PTH receptor are classified as competitive; those which do not are noncompetitive.

Compounds, including antibodies and polypeptides, 15 may be screened for their agonistic or antagonistic properties using the cAMP accumulation, intracellular calcium, and/or inositol phosphate assays described above. Cells expressing PTH receptor on the cell surface are incubated with PTH, PTH-receptor antibody, or a 20 combination of both, for 5 - 60 minutes at 37°C, in the presence of 2 mM IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine, Sigma, St. Louis, MO). Cyclic AMP accumulation is measured by specific radio-immunoassay, as described above. A compound that competes with PTH for binding to 25 the PTH receptor, and that inhibits the effect of PTH on cAMP accumulation, is considered a competitive PTH antagonist. Conversely, a compound that does not compete for PTH binding to the PTH receptor, but which still prevents PTH activation of cAMP accumulation (presumably 30 by blocking the receptor activation site) is considered a non-competitive antagonist. A compound that competes with PTH for binding to the PTH receptor, and which stimulates cAMP accumulation in the presence or absence of PTH, is a competitive agonist. A compound that does 35 not compete with PTH for binding to the PTH receptor but

- 44 -

which is still capable of stimulating cAMP accumulation in the presence or absence of PTH, or which stimulates a higher accumulation than that observed by PTH alone, would be considered a non-competitive agonist.

5 USE

The polypeptides, antibodies, and other compounds of the invention are useful for the diagnosis, classification, prognosis, and/or treatment of disorders which may be characterized as related to the interaction 10 between a cell receptor of the invention and its specific ligand. For example, some forms of hypercalcemia and hypocalcemia are related to the interaction between PTH and PTHrP and the PTH/PTHrP receptor(s). Hypercalcemia is a condition in which there is an abnormal elevation 15 in serum calcium level; it is often associated with other diseases, including hyperparathyroidism, osteoporosis, carcinomas of the breast, lung and prostate, epidermoid cancers of the head and neck of the esophagus, multiple myeloma, and hypernephroma. Hypocalcemia, a condition in 20 which the serum calcium level is abnormally low, may result from a deficiency of effective PTH, e.g., following thyroid surgery.

In a first example, the compounds of the invention are used to manufacture diagnostic agents which are used 25 as diagnostic tools to diagnose hypercalcemia and to distinguish between hypercalcemic conditions, i.e., to differentiate hypercalcemia mediated by PTH or PTHrP (e.g., hyperparathyroidism and humoral hypercalcemia of malignancy), from hypercalcemia associated with diseases 30 which do not involve these factors (e.g., local osteolytic hypercalcemia mediated by the presence of metastatic tumor cells in direct contact with bone, and certain rare types of malignancy-related hypercalcemias mediated by an increase of humoral factors, such as 35 osteoclast activating factor (interleukin), lymphotoxin,

- 45 -

calcitriol, type E prostaglandins, and vitamin D-like sterols).

In one method of diagnosis, serum total and/or ionized calcium levels are measured by standard 5 techniques before and after the administration of the PTH or PTHrP antagonists of the invention. PTH or PTHrP related hypercalcemias would be detectable as a decrease in serum calcium levels following administration of the antagonist of the invention. In contrast, for 10 hypercalcemic conditions mediated by factors other than PTH or PTHrP, the serum calcium levels would remain unchanged even after administration of the antagonist.

Another diagnostic application of the invention permits measurement of the level of PTH or PTHrP in a 15 biological sample in order to diagnose PTH or PTHrP related tumors, e.g., tumors which are associated with humoral hypercalcemia of malignancy, and for monitoring the levels of PTH or PTHrP during cancer therapy. This method involves assaying binding of the recombinant 20 parathyroid hormone receptor of the invention to PTH or PTHrP present in a tissue sample, using the binding assay described herein. The level of binding may be determined directly (e.g., by using radioactively labelled PTH receptor, and assaying the radioactivity bound to 25 endogenous PTH). Alternatively, binding of PTH receptor to the sample (e.g., a tissue section) may be followed by staining of the tissue sections with an antibody specific for the PTH receptor, using standard immunological techniques (Chin et al., *Hybridoma* 5:339, 1986).

30 In a third diagnostic approach, one could stably transfect cell lines (by the methods described in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Publishers, New York, 1987) with a PTH receptor gene linked to an appropriate promoter (e.g., the 35 metallothioneine promoter). Alternatively, the PTH/PTHrP

- 46 -

receptor could be expressed from a eukaryotic vector, i.e., pCDNAI, and cotransfected with a mutant DHFR gene that will allow further gene amplification via methotrexate selection (Simonsen et al., Proc. Natl. 5 Acad. Sci., 80:2495-2499, 1983). Such high-level expression of the gene produces an immortal cell line which is oversensitive to PTH or PTHrP. Such cells provide a particularly useful tool for detecting serum blood levels of PTH or PTHrP. Such a cell line may be 10 used for diagnosis of conditions involving elevated PTH or PTHrP levels (e.g., those described above) or for conditions involving unusually low levels of PTH or PTHrP (e.g., those described above). Such a cell line is also useful for monitoring the regression or increase of PTH 15 or PTHrP levels during therapy for hypercalcemia or hypocalcemia, respectively.

A patient who is suspected of being hypercalcemic may be treated using the compounds of the invention. Rapid intervention is important because symptoms may 20 appear abruptly and, unless reversed, can be fatal. In one application, serum calcium levels are stabilized by an immediate course of treatment which includes antagonists of PTH or PTHrP. Such antagonists include the compounds of the invention which have been determined 25 (by the assays described herein) to interfere with PTH receptor-mediated cell activation. To administer the antagonist, the appropriate antibody or peptide (is used in the manufacture of a medicament, generally by being formulated in an appropriate carrier such as 30 physiological saline, and administered intravenously, at a dosage that provides adequate competition for PTH or PTHrP binding to the PTH receptor (e.g., a dosage sufficient to lower the serum calcium level to below 10 mg/dl). Typical dosage would be 1 ng to 10 mg of the 35 antibody or peptide per kg body weight per day.

- 47 -

Treatment may be repeated as necessary for long term maintenance of acceptable calcium levels (i.e., levels < 10.1 mg/dl). This may be necessary for acute treatment of an underlying disease condition triggering

- 5 hypercalcemia; or it may be used, e.g., for chronic treatment of conditions such as osteoporosis.

In another application, the compounds of the invention which have been characterized, according to the methods of the invention, to be agonists are used  
10 therapeutically to treat hypocalcemia: e.g., that resulting from the partial or complete surgical removal of the parathyroid glands. Agonists may be formulated in a suitable carrier (e.g., physiological saline) and are preferably administered intravenously in a dosage that  
15 causes a rise in serum calcium to an acceptable level (i.e., approximately 8 mg/dl). A useful dosage range would be 1 ng to 10 mg of the agonist per kg body weight per day. Treatment may be repeated as necessary to maintain suitable serum calcium levels; long term  
20 treatment may be necessary for patients who have undergone parathyroid gland removal.

The nucleic acids of the invention may also be used therapeutically. Oligonucleotides which are antisense to PTH receptor mRNA (or nucleic acid  
25 constructs which express RNA that is antisense to PTH receptor mRNA) may be utilized as an anticancer therapy. This approach is useful, e.g., for hypercalcemias resulting from a genomic rearrangement or amplification which increases the amount or activity of PTH receptor,  
30 PTH or PTHrP. The method would involve introduction of the antisense oligonucleotide into the tumor cells *in vivo*. The antisense strand hybridizes with endogenous PTH receptor mRNA, interfering with translation of the protein, thereby reducing production of PTH receptor in  
35 such cells, and reducing PTH/PTHrP-associated neoplastic

- 48 -

growth. Methods for antisense design and introduction into host cells are described, for example, in Weinberg et al., U.S. Patent No. 4,740,463, herein incorporated by reference. The biochemical characterization of the OK-H, OK-O and R15B PTH/PTHrP receptors of the invention demonstrate that the two transduction pathways now known to be triggered by the interaction of PTH with its receptor are distinct and may be separated. The predicted amino acid sequences of these receptors indicate that OK-H, which does not appear to activate inositol phosphate metabolism to any detectable degree, is 70 amino acids shorter at the carboxy-terminus than OK-O or R15B. By using the sequences of the invention and the information disclosed herein, one could clone and then alter (e.g. by site-directed mutagenesis) PTH/PTHrP receptor genes from any species to generate PTH/PTHrP receptors which do not activate phospholipase C. This could potentially allow the separation of different PTH-mediated actions, including bone resorption and bone formation, and could of great importance for the treatment of various bone disorders such as osteoporosis.

Nucleic acids of the invention which encode a PTH receptor may also be linked to a selected tissue-specific promoter and/or enhancer and the resultant hybrid gene introduced, by standard methods (e.g., as described by Leder et al., U.S. Patent No. 4,736,866, herein incorporated by reference), into an animal embryo at an early developmental stage (e.g., the fertilized oocyte stage), to produce a transgenic animal which expresses elevated levels of PTH receptor in selected tissues (e.g., the osteo calcin promoter for bone). Such promoters are used to direct tissue-specific expression of the PTH receptor in the transgenic animal. The form of PTH receptor utilized can be one which encodes a PTH receptor similar to that of the animal species used, or

- 49 -

it can encode the PTH receptor homolog of a different species. In one particular example, transgenic chickens are engineered to express the PTH receptor from a promoter which directs high-level expression in chicken oviducts. Such an animal is expected to produce eggs with higher calcium content, and thus harder shells.

Other Embodiments

Other embodiments are within the following claims. For example, the nucleic acid of the invention includes genes or cDNAs or RNAs originally isolated from any vertebrate species, including birds or mammals such as marsupials, rodents, or humans. The high degree of homology demonstrated for the PTH receptors from such diverse species as opossum, rat, and human indicates that the methods of isolating PTH receptors disclosed herein will be broadly applicable to the isolation of related cell receptors from a wide variety of species.

- 50 -

COMPUTER SUBMISSION OF DNA AND AMINO ACID SEQUENCES

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT:  
Segre, Gino V.  
Kronenberg, Henry M.  
Abou-Samra, Abdul-Badi  
Juppner, Harald  
Potts, John T., Jr.  
Schipani, Ernestina
- (ii) TITLE OF INVENTION: PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA  
ENCODING SAME
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:  
(A) ADDRESSEE: Fish & Richardson  
(B) STREET: 225 Franklin Street  
(C) CITY: Boston  
(D) STATE: Massachusetts  
(E) COUNTRY: U.S.A.  
(F) ZIP: 02110-2804
- (v) COMPUTER READABLE FORM:  
(A) MEDIUM TYPE: 3.5" Diskette, 1.44 Mb storage  
(B) COMPUTER: IBM PS/2 Model 50Z or 55SX  
(C) OPERATING SYSTEM: IBM P.C. DOS (Version 3.30)  
(D) SOFTWARE: WordPerfect (Version 5.0)
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:  
(A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE:  
(C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:  
(A) APPLICATION NUMBER: 07/681,702  
(B) FILING DATE: April 5, 1991
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:  
(A) NAME: Paul T. Clark  
(B) REGISTRATION NUMBER: 30,162  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 00786/071001
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:  
(A) TELEPHONE: (617) 542-5070  
(B) TELEFAX: (617) 542-8906

- 51 -

(C) TELEX:

200154

(2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1862
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 1:

GGGGCACAGC CACCCCTGTTG GTAGTCCAGG GGGCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GCCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC Met Gly Ala Pro Arg Ile	60 115 1               5
TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val	163 10              15              20
TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile	211 25              30              35
ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG Ile Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu	259 40              45              50
GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser	307 55              60              65              70
AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC Arg Ser Ala Lys Thr Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro	355 75              80              85
CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp	403 90              95              100
GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly	451 105             110             115
GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp	499 120             125             130
TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser	547 135             140             145             150

- 52 -

TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CCG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu 155	160	165	595	
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp 170	175	180	643	
CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser 185	190	195	691	
CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys 200	205	210	739	
ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg 215	220	225	230	787
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser 235	240	245	835	
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr 250	255	260	883	
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala 265	270	275	931	
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu 280	285	290	979	
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser 295	300	305	310	1027
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro 315	320	325	1075	
GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn 330	335	340	1123	
ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln 345	350	355	1171	

- 53 -

GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT		1219	
Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn			
360	365	370	
ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA		1267	
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg			
375	380	385	390
TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC		1315	
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val			
395	400	405	
CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG		1363	
Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro			
410	415	420	
TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA		1411	
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu			
425	430	435	
ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT		1459	
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys			
440	445	450	
TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA		1507	
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg			
455	460	465	470
TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT		1555	
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser			
475	480	485	
ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG		1603	
Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val			
490	495	500	
GGA CCT CGA GGG CGC TGG CCT TGT CCC TCA GCC CTC GAC TAGCTCCTGG		1652	
Gly Pro Arg Gly Gly Trp Pro Cys Pro Ser Ala Leu Asp			
505	510	515	
GGCTGGAGCC AGTGCCAATG GCCATCACCA GTTGCCTGGC TATGTGAAGC ATGGTTCCAT	1712		
TTCTGAGAAC TCATTGCCTT CATCTGGCCC AGAGCCTGGC ACCAAAGATG ACGGGTATCT	1772		
CAATGGCTCT GGACTTTATG AGCCAATGGT TGGGAAACAG CCCCTCCAC TCCTGGAGGA	1832		
GGAGAGAGAG ACAGTCATGT GACCCATATC	1862		

- 54 -

## (2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH:	1863
(B) TYPE:	nucleic acid
(C) STRANDEDNESS:	single
(D) TOPOLOGY:	linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 2:

TGGGCACAGC CACCCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG	60
GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGAAAC GCCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC	115
Met Gly Ala Pro Arg Ile	
1 5	
TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC	163
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val	
10 15 20	
TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC	211
Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile	
25 30 35	
ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG	259
Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu	
40 45 50	
GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA	307
Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser	
55 60 65 70	
AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC	355
Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro	
75 80 85	
CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT	403
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp	
90 95 100	
GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA	451
Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly	
105 110 115	
GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC	499
Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp	
120 125 130	

- 55 -

TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser 135 140 145 150	547
TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu 155 160 165	595
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp 170 175 180	643
CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser 185 190 195	691
CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys 200 205 210	739
ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg 215 220 225 230	787
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser 235 240 245	835
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr 250 255 260	883
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala 265 270 275	931
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu 280 285 290	979
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser 295 300 305 310	1027
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro 315 320 325	1075
GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn 330 335 340	1123

- 56 -

ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG		1171
Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln		
345	350	355
GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT		1219
Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn		
360	365	370
ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA		1267
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg		
375	380	385
TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC		1315
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val		
395	400	405
CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG		1363
Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro		
410	415	420
TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA		1411
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu		
425	430	435
ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT		1459
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys		
440	445	450
TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA		1507
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg		
455	460	465
TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT		1555
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser		
475	480	485
ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG		1603
Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val		
490	495	500
GGA CCT CGA GGG GGG CTG GCC TTG TCC CTC AGC CCT CGA CTA CCT CCT		1651
Gly Pro Arg Gly Gly Leu Ala Leu Ser Leu Ser Pro Arg Leu Ala Pro		
505	510	515
GGG GCT GGA GCC AGT GCC AAT GGC CAT CAC CAG TTG CCT GGC TAT GTG		1699
Gly Ala Gly Ala Ser Ala Asn Gly His His Gln Leu Pro Gly Tyr Val		
520	525	530
AAG CAT GGT TCC ATT TCT GAG AAC TCA TTG CCT TCA TCT GGC CCA GAG		1747
Lys His Gly Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Pro Ser Ser Gly Pro Glu		
535	540	545
		550

- 57 -

CCT GGC ACC AAA GAT GAC GGG TAT CTC AAT GGC TCT GGA CTT TAT GAG	1795
Pro Gly Thr Lys Asp Asp Gly Tyr Leu Asn Gly Ser Gly Leu Tyr Glu	
555	560
565	
CCA ATG GTT GGG GAA CAG CCC CCT CCA CTC CTG GAG GAG AGA GAG	1843
Pro Met Val Gly Glu Gln Pro Pro Leu Leu Glu Glu Glu Arg Glu	
570	575
580	
ACA GTC ATG TGACCCATAT C	1863
Thr Val Met	
585	

## (2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 3:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH:	2051
(B) TYPE:	nucleic acid
(C) STRANDEDNESS:	double
(D) TOPOLOGY:	linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 3:

GGCGGGGGCC GCGGCGGCCGA GCTCGGAGGC CGGCGGCCGC TGCCCCGAGG GACGCCGCC	60
TAGGCGGTGG CG ATG GGG GCC CGG ATC GCA CCC AGC CTG GCG CTC	108
Met Gly Ala Ala Arg Ile Ala Pro Ser Leu Ala Leu	
1	5
10	
CTA CTC TGC TGC CCA GTG CTC AGC TCC GCA TAT GCG CTG GTG GAT GCG	156
Leu Leu Cys Cys Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Val Asp Ala	
15	20
25	
GAC GAT GTC TTT ACC AAA GAG GAA CAG ATT TTC CTG CTG CAC CGT GCC	204
Asp Asp Val Phe Thr Lys Glu Glu Gln Ile Phe Leu Leu His Arg Ala	
30	35
40	
CAG GCG CAA TGT GAC AAG CTG CTC AAG GAA GTT CTG CAC ACA GCA GCC	252
Gln Ala Gln Cys Asp Lys Leu Leu Lys Glu Val Leu His Thr Ala Ala	
45	50
55	60
AAC ATA ATG GAG TCA GAC AAG GGC TGG ACA CCA GCA TCT ACG TCA GGG	300
Asn Ile Met Glu Ser Asp Lys Gly Trp Thr Pro Ala Ser Thr Ser Gly	
65	70
75	
AAG CCC AGG AAA GAG AAG GCA TCG GGA AAG TTC TAC CCT GAG TCT AAA	348
Lys Pro Arg Lys Glu Lys Ala Ser Gly Lys Phe Tyr Pro Glu Ser Lys	
80	85
90	
GAG AAC AAG GAC GTG CCC ACC GGC AGC AGG CGC AGA GGG CGT CCC TGT	396
Glu Asn Lys Asp Val Pro Thr Gly Ser Arg Arg Arg Gly Arg Pro Cys	
95	100
105	

- 58 -

CTG CCC GAG TGG GAC AAC ATC GTT TGC TGG CCA TTA GGG GCA CCA GGT		444
Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Leu Gly Ala Pro Gly		
110	115	120
GAA GTG GTG GCA GTA CCT TGT CCC GAT TAC ATT TAT GAC TTC AAT CAC		492
Glu Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Ile Tyr Asp Phe Asn His		
125	130	135
140		
AAA GGC CAT GCC TAC AGA CGC TGT GAC CGC AAT GGC AGC TGG GAG GTG		540
Lys Gly His Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Arg Asn Gly Ser Trp Glu Val		
145	150	155
GTT CCA GGG CAC AAC CGG ACG TGG GCC AAC TAC AGC GAG TGC CTC AAG		588
Val Pro Gly His Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu Cys Leu Lys		
160	165	170
TTC ATG ACC AAT GAG ACG CGG GAA CGG GAG GTA TTT GAC CGC CTA GGC		636
Phe Met Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp Arg Leu Gly		
175	180	185
ATG ATC TAC ACC GTG GGA TAC TCC ATG TCT CTC GCC TCC CTC ACG GTG		684
Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Met Ser Leu Ala Ser Leu Thr Val		
190	195	200
GCT GTG CTC ATC CTG GCC TAT TTT AGG CGG CTG CAC TGC ACG CGC AAC		732
Ala Val Leu Ile Leu Ala Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys Thr Arg Asn		
205	210	215
220		
TAC ATC CAC ATG CAC ATG TTC CTG TCG TTT ATG CTG CGC GCC GCG AGC		780
Tyr Ile His Met His Met Phe Leu Ser Phe Met Leu Arg Ala Ala Ser		
225	230	235
ATC TTC GTG AAG GAC GCT GTG CTC TAC TCT GGC TTC ACG CTG GAT GAG		828
Ile Phe Val Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Asp Glu		
240	245	250
GCC GAG CGC CTC ACA GAG GAA GAG TTG CAC ATC ATC GCG CAG GTG CCA		876
Ala Glu Arg Leu Thr Glu Glu Leu His Ile Ile Ala Gln Val Pro		
255	260	265
CCT CCG CCG GCC GCT GCC GTA GGC TAC GCT GGC TGC CGC GTG GCG		924
Pro Pro Pro Ala Ala Ala Val Gly Tyr Ala Gly Cys Arg Val Ala		
270	275	280
GTG ACC TTC TTC CTC TAC TTC CTG GCT ACC AAC TAC TAC TGG ATT CTG		972
Val Thr Phe Phe Leu Tyr Phe Leu Ala Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu		
285	290	295
300		
GTG GAG GGG CTG TAC TTG CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCC TTT TTC TCA		1020
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser		
305	310	315

- 59 -

GAG AAG AAG TAC CTG TGG GGC TTC ACC ATC TTT GGC TGG GGT CTA CCG		1068
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Ile Phe Gly Trp Gly Leu Pro		
320	325	330
GCT GTC TTC GTG GCT GTG TGG GTC GGT GTC AGA GCA ACC TTG GCC AAC		1116
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Gly Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn		
335	340	345
ACT GGG TGC TGG GAT CTG AGC TCC GGG CAC AAG AAG TGG ATC ATC CAG		1164
Thr Gly Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly His Lys Lys Trp Ile Ile Gln		
350	355	360
GTG CCC ATC CTG GCA TCT GTT GTG CTC AAC TTC ATC CTT TTT ATC AAC		1212
Val Pro Ile Leu Ala Ser Val Val Leu Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn		
365	370	375
380		
ATC ATC CGG GTG CTT GCC ACT AAG CTT CGG GAG ACC AAT GCG GGC CGG		1260
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg		
385	390	395
TGT GAC ACC AGG CAG CAG TAC CGG AAG CTG CTC AGG TCC ACG TTG GTG		1308
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Arg Ser Thr Leu Val		
400	405	410
CTC GTG CCG CTC TTT GGT GTC CAC TAC ACC GTC TTC ATG GCC TTG CCG		1356
Leu Val Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Thr Val Phe Met Ala Leu Pro		
415	420	425
TAC ACC GAG GTC TCA GGG ACA TTG TGG CAG ATC CAG ATG CAT TAT GAG		1404
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Thr Leu Trp Gln Ile Gln Met His Tyr Glu		
430	435	440
445		
ATG CTC TTC AAC TCC TTC CAG GGA TTT TTT GTT GCC ATC ATA TAC TGT		1452
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys		
450	455	460
TTC TGC AAT GGT GAG GTG CAG GCA GAG ATT AGG AAG TCA TGG AGC CGC		1500
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Arg Lys Ser Trp Ser Arg		
465	470	475
TGG ACA CTG GCG TTG GAC TTC AAG CGC AAA GCA CGA AGT GGG AGT AGC		1548
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser		
480	485	490
AGC TAC AGC TAT GGC CCA ATG GTG TCT CAC ACG AGT GTG ACC AAT GTG		1596
Ser Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val		
495	500	505
GGC CCC CGT GCA GGA CTC AGC CTC CCC CTC AGC CCC CGC CTG CCT CCT		1644
Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu Ser Pro Arg Leu Pro Pro		
510	515	520
525		

- 60 -

GCC ACT ACC AAT GGC CAC TCC CAG CTG CCT GGC CAT GCC AAG CCA GGG 1692  
Ala Thr Thr Asn Gly His Ser Gln Leu Pro Gly His Ala Lys Pro Gly  
530 535 540

GCT CCA GCC ACT GAG ACT GAA ACC CTA CCA GTC ACT ATG GCG GTT CCC 1740  
Ala Pro Ala Thr Glu Thr Glu Thr Leu Pro Val Thr Met Ala Val Pro  
545 550 555

AAG GAC GAT GGA TTC CTT AAC GGC TCC TGC TCA GGC CTG GAT GAG GAG 1788  
Lys Asp Asp Gly Phe Leu Asn Gly Ser Cys Ser Gly Leu Asp Glu Glu  
560 565 570

GCC TCC GGG TCT GCG CGG CCG CCT CCA TTG TTG CAG GAA GGA TGG GAA 1836  
Ala Ser Gly Ser Ala Arg Pro Pro Pro Leu Leu Gln Glu Gly Trp Glu  
575 580 585

ACA GTC ATG TGACTGGGCA CTAGGGGCT AGACTGCTGG CCTGGCACA 1885  
Thr Val Met  
590

TGGACAGATG GACCAAGAAG CCAGTGTTG GCTGGTTGTC TATTGGGAT CTGGACCAGG 1945  
AAGATAACAA AAGGAAAATG GAAGTGGACG AAGCAGAGAA GAAGGAAGAG GTTTGCAGG 2005  
AATTAATAT GTTCCTCAG TTGGATGATG AGGACACAAG GAAGGC 2051

What is claimed is:

- 61 -

Claims

1        1. Isolated DNA comprising a DNA sequence  
2    encoding a cell receptor of a vertebrate animal, said  
3    receptor having an amino acid sequence with at least 30%  
4    identity to the amino acid sequence shown in FIG. 3.

1        2. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2    DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3    sequence shown in FIG. 1 (SEQ. ID NO. 1).

1        3. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2    DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3    sequence shown in FIG. 3 (SEQ. ID NO. 3).

1        4. The isolated DNA of claim 1, said isolated  
2    DNA being (8A6), deposited with the ATCC and designated  
3    ATCC Accession No. 68570.

1        5. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2    DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3    sequence shown in Fig. 6 (SEQ. ID. NO. 4).

1        6. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2    DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3    1 (SEQ. ID NO. 1).

1        7. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2    DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3    3 (SEQ. ID NO. 3).

1        8. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2    DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3    6 (SEQ. ID NO. 4).

- 62 -

1           9. A purified preparation of a vector, said  
2   vector comprising a DNA sequence encoding a parathyroid  
3   hormone receptor.

1           10. A cell containing the isolated DNA of claim  
2   1.

1           11. The cell of claim 10, wherein said cell is  
2   capable of expressing said cell receptor from said  
3   isolated DNA.

1           12. An essentially homogenous population of  
2   cells, each of which comprises the isolated DNA of claim  
3   1.

1           13. Isolated DNA comprising a DNA sequence  
2   encoding a polypeptide capable of binding parathyroid  
3   hormone or parathyroid-hormone-related protein.

1           14. A method for producing a polypeptide, said  
2   method comprising:  
3                 providing a cell comprising isolated DNA  
4   encoding a parathyroid hormone receptor or a fragment  
5   thereof; and  
6                 culturing said cell under conditions  
7   permitting expression of a polypeptide from said DNA.

1           15. A single-stranded DNA comprising a portion  
2   of a parathyroid hormone receptor gene, said portion  
3   being at least 18 nucleotides long.

1           16. The single-stranded DNA of claim 15, wherein  
2   said portion is less than all of said parathyroid hormone  
3   receptor gene.

- 63 -

1           17. The single-stranded DNA of claim 15, wherein  
2    said DNA is detectably labeled.

1           18. A single-stranded DNA comprising a portion  
2    of a parathyroid hormone receptor cDNA, said portion  
3    being at least 18 nucleotides long.

1           19. The single-stranded DNA of claim 18, wherein  
2    said DNA is antisense.

1           20. Parathyroid hormone receptor produced by  
2    expression of a recombinant DNA molecule encoding a  
3    parathyroid hormone receptor.

1           21. An essentially purified preparation of the  
2    parathyroid hormone receptor of claim 20.

1           22. An essentially purified preparation of the  
2    parathyroid receptor produced by the expression of the  
3    DNA of claim 5.

1           23. A polypeptide comprising at least six amino  
2    acids and less than the complete amino acid sequence of a  
3    parathyroid hormone receptor, said polypeptide capable of  
4    binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-  
5    related protein.

1           24. The polypeptide of claim 23, wherein said  
2    parathyroid hormone receptor is a human parathyroid  
3    receptor.

1           25. The polypeptide of claim 23, wherein said  
2    fragment comprises  
3           (a) TNETREREVFDRLGMIYTVG,  
4           (b) YLYSGFTLDEAERLTEEEL,

- 64 -

5                   (c) VTFFFLYFLATNYYWILVEG,  
6                   (d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP,  
7                   (e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM,  
8                   (f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA,  
9                   (g) FFRLHCTRNY,  
10                  (h) EKKYLWGFTL,  
11                  (i) VLATKLRETNAGRCRCDTRQQYRKLLK, or  
12                  (j) a fragment of (a) - (i) which is capable of  
13                  binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-  
14                  related protein.

1                  26. A therapeutic composition comprising, in a  
2                  pharmaceutically-acceptable carrier, (a) a parathyroid  
3                  hormone receptor or (b) a polypeptide comprising a  
4                  fragment of said receptor.

1                  27. An antibody capable of forming an immune  
2                  complex with a parathyroid hormone receptor.

1                  28. A therapeutic composition comprising the  
2                  antibody of claim 27 and a pharmaceutically-acceptable  
3                  carrier.

1                  29. A method of reducing the level of calcium in  
2                  the blood of a mammal, which method comprises  
3                  administering the therapeutic composition of claim 26 to  
4                  said mammal in a dosage effective to inhibit activation  
5                  by parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
6                  protein of a parathyroid hormone receptor of said mammal.

1                  30. A method of reducing the level of calcium in  
2                  the blood of a mammal, which method comprises  
3                  administering the therapeutic composition of claim 28 to  
4                  said mammal in a dosage effective to inhibit activation

- 65 -

5 by parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
6 protein of a parathyroid hormone receptor of said mammal.

1           31. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone for binding to a  
3 parathyroid hormone receptor, said method comprising:

4           (a) contacting the polypeptide of claim 23 with  
5 a parathyroid hormone, (i) in the presence or (ii) in the  
6 absence of a candidate compound; and

7           (b) comparing (i) the level of binding of said  
8 polypeptide to said parathyroid hormone in the presence  
9 of said candidate compound, with (ii) the level of  
10 binding of said polypeptide to said parathyroid hormone  
11 in the absence of said candidate compound; a lower level  
12 of binding in the presence of said candidate compound  
13 than in its absence indicating that said candidate  
14 compound is capable of competing with said parathyroid  
15 hormone for binding to said receptor.

1           32. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone-related protein  
3 for binding to a parathyroid hormone receptor, said  
4 method comprising:

5           (a) contacting the polypeptide of claim 23 with  
6 a parathyroid hormone-related protein, (i) in the  
7 presence or (ii) in the absence of a candidate compound;  
8 and

9           (b) comparing (i) the level of binding of said  
10 polypeptide to said parathyroid hormone-related protein  
11 in the presence of said candidate compound, with (ii) the  
12 level of binding of said polypeptide to said parathyroid  
13 hormone-related protein in the absence of said candidate  
14 compound; a lower level of binding in the presence of  
15 said candidate compound than in its absence indicating  
16 that said candidate compound is capable of competing with

- 66 -

17 said parathyroid hormone-related protein for binding to  
18 said receptor.

1           33. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone for binding to a  
3 parathyroid hormone receptor, said method comprising:

4           (a) combining a parathyroid hormone with the  
5 cell of claim 11, (i) in the presence or (ii) in the  
6 absence of a candidate compound; and

7           (b) comparing (i) the level of binding of said  
8 receptor to said parathyroid hormone in the presence of  
9 said candidate compound, with (ii) the level of binding  
10 of said receptor to said parathyroid hormone in the  
11 absence of said candidate compound; a lower level of  
12 binding in the presence of said candidate compound than  
13 in its absence indicating that said candidate compound is  
14 capable of competing with said parathyroid hormone for  
15 binding to said receptor.

1           34. A compound capable of inhibiting the binding  
2 of parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
3 protein to a parathyroid receptor on the surface of a  
4 cell.

1           35. A therapeutic composition comprising the  
2 compound of claim 34 and a pharmaceutically-acceptable  
3 carrier.

1           36. A method for identifying a DNA sequence  
2 homologous to a parathyroid hormone receptor-encoding DNA  
3 sequence, said method comprising:  
4           providing a genomic or cDNA library;  
5           contacting said library with the single-  
6 stranded DNA of claim 18, under conditions permitting

- 67 -

7 hybridization between said single-stranded DNA and a  
8 homologous DNA sequence in said library; and  
9 identifying a clone from said library which  
10 hybridizes to said single-stranded DNA, said  
11 hybridization being indicative of the presence in said  
12 clone of a DNA sequence homologous to a parathyroid  
13 hormone receptor-encoding DNA sequence.

1           37. A transgenic non-human vertebrate animal  
2 bearing a transgene comprising a DNA sequence encoding  
3 parathyroid hormone receptor or a fragment thereof.

1           38. A diagnostic method comprising:  
2           (a) obtaining a first blood sample from an  
3 animal;       (b) administering the composition of claim  
4 35 to said animal;  
5           (c) obtaining a second blood sample from said  
6 animal subsequent to said administration of said  
7 composition; and  
8           (d) comparing the calcium level in said first  
9 blood sample with that in said second blood sample, a  
10 lower calcium level in said second blood sample being  
11 diagnostic for a parathyroid hormone-related condition.  
12          39. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
13 DNA sequence encodes a parathyroid hormone receptor.

1  
2          40. The parathyroid hormone receptor of claim 20  
3 for use in therapy or diagnosis.

4          41. The polypeptide of claim 23 for use in  
5 therapy or diagnosis.

6          42. The antibody of claim 27 for use in therapy  
7 or diagnosis.

- 68 -

8        43. The therapeutic composition of claim 26 for  
9    use in therapy for the inhibition of activation by  
10   parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
11   protein of a parathyroid hormone receptor of a mammal or  
12   for the reduction of the level of calcium in the blood of  
13   a mammal.

14        44. The therapeutic composition of claim 28 for  
15   use in therapy for the inhibition of activation by  
16   parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
17   protein of a parathyroid hormone receptor of a mammal or  
18   for the reduction of the level of calcium in the blood of  
19   a mammal.

20        45. The parathyroid hormone receptor of claim 20  
21   for use in the manufacture of a medicament for use in  
22   therapy for the inhibition of activation by parathyroid  
23   hormone or parathyroid hormone-related protein of a  
24   parathyroid hormone receptor of a mammal or for the  
25   reduction of the level of calcium in the blood of a  
26   mammal.

27        46. The polypeptide of claim 23 for use in the  
28   manufacture of a medicament for use in therapy for the  
29   inhibition of activation by parathyroid hormone or  
30   parathyroid hormone-related protein of a parathyroid  
31   hormone receptor of a mammal or for the reduction of the  
32   level of calcium in the blood of a mammal.

33        47. The antibody of claim 27 for use in the  
34   manufacture of a medicament for use in therapy for the  
35   inhibition of activation by parathyroid hormone or  
36   parathyroid hormone-related protein of a parathyroid  
37   hormone receptor of a mammal or for the reduction of the  
38   level of calcium in the blood of a mammal.

- 69 -

39           48. A method for identifying a hypercalcemic  
40 condition in a patient which is mediated by parathyroid  
41 hormone or parathyroid hormone-related protein, the  
42 method comprising

43           (a) determining the calcium level of a first  
44 blood sample from the patient,

45           (b) determining the calcium level of a second  
46 blood sample from the patient taken at a time subsequent  
47 after administration of the therapeutic composition of  
48 claim 26, and

49           (c) comparing the calcium levels of the two  
50 blood samples, a lower calcium level in the second blood  
51 sample being indicative of a condition related to  
52 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
53 protein in the patient.

54           49. A method for identifying a hypercalcemic  
55 condition in a patient which is mediated by parathyroid  
56 hormone or parathyroid hormone-related protein, the  
57 method comprising

58           (a) determining the calcium level of a first  
59 blood sample from the patient,

60           (b) determining the calcium level of a second  
61 blood sample from the patient taken at a subsequent time  
62 after administration of the therapeutic composition of  
63 claim 28, and

64           (c) comparing the calcium levels of the two  
65 blood samples, a lower calcium level in the second blood  
66 sample being indicative of a condition related to  
67 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
68 protein in the patient.

FIG. I

FIG. :

CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser 185 190 195	691
CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys 200 205 210	739
ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg 215 220 225 230	787
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser 235 240 245	835
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr 250 255 260	883
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala 265 270 275	931
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu 280 285 290	979
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser 295 300 305 310	1027
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro 315 320 325	1075
GCC TTT GTC GCT GTG TGG ATT GCG GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC Ala Ile Phe Val Ala Val Trp Val Val Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn 330 335 340	1123
ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG CGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Ile Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln 345 350 355	1171
GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTC AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn 360 365 370	1219
ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg 375 380 385 390	1267

## FIG. 1

TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val 395 400 405	1315
CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro 410 415 420	1353
TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu 425 430 435	1411
ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys 440 445 450	1459
TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg 455 460 465 470	1507
TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser 475 480 485	1555
ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val 490 495 500	1603
GGA CCT CGA GGG GGC TGG CCT TGT CCC TCA GCC CTC GAC TAGCTCCTGG Gly Pro Arg Gly Gly Trp Pro Cys Pro Ser Ala Leu Asp 505 510 515	1652
GGCTGGAGCC AGTGCCATG GCCATCACCA GTTGCCTGGC TATGTGAAGC ATGGTTCCAT TTCTGAGAAC TCATTGCTT CATCTGGCCC AGAGCCTGGC ACCAAAGATG ACGGGTATCT CAATGGCTCT GGACTTTATG AGCCAATGGT TGGGGAACAG CCCCCCTCCAC TCCTGGAGGA GGAGAGAGAG ACAGTCATGT GACCCATATC	1711 1771 1831 1862

1 of 3

4 / 30

FIG. 2

TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG	60
GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GGCGGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC Met Gly Ala Pro Arg Ile	115
1 5	
TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val	163
10 15 20	
TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile	211
25 30 35	
ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu	259
40 45 50	
GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser	307
55 60 65 70	
AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro	355
75 80 85	
CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp	403
90 95 100	
GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG SAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA Gly Phe Cys Leu Pro Glu Tyr Ser Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly	451
105 110 115	
GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC Val Pro Gly Lys Val Val Ala Tyr Ile Phe Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp	499
120 125 130	
TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser	547
135 140 145 150	
TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu	595
155 160 165	
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp	643
170 175 180	

5/30

2 of 2

FIG. 2

CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser 185 190 195	691
CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys 200 205 210	707
ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg 215 220 225 230	737
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser 235 240 245	835
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr 250 255 260	883
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala 265 270 275	931
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu 280 285 290	979
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser 295 300 305 310	1027
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT Glu Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro 315 320 325	1075
GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn 330 335 340	1123
ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln 345 350 355	1171
GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn 360 365 370	1219
ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg 375 380 385 390	1267

TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val 395 400 405	1315
CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro 410 415 420	1363
TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu 425 430 435	1411
ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys 440 445 450	1459
TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg 455 460 465 470	1507
TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CCG AAG GCC CCG AGT GGC AGC AGT Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser 475 480 485	1555
ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val 490 495 500	1603
GGA CCT CGA GGG GGG CTG GCC TTG TCC CTC AGC CCT CGA CTA GCT CCT Gly Pro Arg Gly Gly Leu Ala Leu Ser Leu Ser Pro Arg Leu Ala Pro 505 510 515	1651
GGG GCT GGA GCC AGT GCC AAT GGC CAT CAC CAG TTG CCT GGC TAT GTG Gly Ala Gly Ala Ser Ala Asn Gly His His Gln Leu Pro Gly Tyr Val 520 525 530	1699
AAG CAT CCT TCC ATT TCT GAG AAC TCA TTG CCT TCA TCT GGC CCA GAG Lys His Gly Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Pro Ser Ser Gly Pro Glu 535 540 545 550	1747
CCT GGC ACC AAA GAT GAC GGG TAT CTC AAT GGC TCT GGA CTT TAT GAG Pro Gly Thr Lys Asp Asp Gly Tyr Leu Asn Gly Ser Gly Leu Tyr Glu 555 560 565	1795
CCA ATG GTT GGG GAA CAG CCC CCT CCA CTC CTG GAG GAG GAG AGA GAG Pro Met Val Gly Glu Gln Pro Pro Pro Leu Leu Glu Glu Glu Arg Glu 570 575 580	1843
ACA GTC ATG TGACCCATAT C Thr Val Met 585	1863

7/30

1 of 3

FIG. 3

GGCGGGGGCC	GCGGCGGCCA	GCTCGGAGGC	CGGCGGCCGC	TGCCCGAGG	GACGCC	60
TAGGCGGTGG CG ATG GGG GCC GCC CGG ATC GCA CCC AGC CTG GCG CTC Met Gly Ala Ala Arg Ile Ala Pro Ser Leu Ala Leu						108
1	5			10		
CTA CTC TGC TGC CCA GTG CTC AGC TCC GCA TAT GCG	CTG GTG	GAT GCG				115
Leu Leu Cys Cys Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Val Asp Ala						
15	20	25				
GAC GAT GTC TTT ACC AAA GAG GAA CAG ATT TTC CTG CTG CAC CGT GCC						204
Asp Asp Val Phe Thr Lys Glu Glu Gln Ile Phe Leu Leu His Arg Ala						
30	35	40				
CAG GCG CAA TGT GAC AAG CTG CTC AAG GAA GTT CTG CAC ACA GCA GCC						215
Gln Ala Gln Cys Asp Lys Leu Leu Lys Glu Val Leu His Thr Ala Ala						
45	50	55				60
AAC ATA ATG GAG TCA GAC AAG GGC TGG ACA CCA GCA TCT ACG TCA GGG						300
Asn Ile Met Glu Ser Asp Lys Gly Trp Thr Pro Ala Ser Thr Ser Gly						
65	70	75				
AAG CCC AGG AAA GAG AAG GCA TCG GGA AAG TTC TAC CCT GAG TCT AAA						348
Lys Pro Arg Lys Glu Lys Ala Ser Gly Lys Phe Tyr Pro Glu Ser Lys						
80	85	90				
GAG AAC AAG GAC GTG CCC ACC GGC AGC AGG CGC AGA GGG CGT CCC TGT						396
Glu Asn Lys Asp Val Pro Thr Gly Ser Arg Arg Arg Gly Arg Pro Cys						
95	100	105				
CTG CCC GAG TGG GAC AAC ATC GTT TGC TGG CCA TTA GGG GCA CCA GGT						444
Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Leu Gly Ala Pro Gly						
110	115	120				
GAA GTG GTG GCA GTA CCT TGT CCC CAT TAC ATT TAT GAC TTC AAT CAC						491
Glu Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Ile Tyr Asp Phe Asn His						
125	130	135				140
AAA GGC CAT GCC TAC AGA CGC TGT GAC CGC AAT GGC AGC TGG GAG GTG						540
Lys Gly His Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Arg Asn Gly Ser Trp Glu Val						
145	150	155				
GTG CCA GGG CAC AAC CGG ACG TGG GCC AAC TAC AGC GAG TGC CTC AAG						588
Val Pro Gly His Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu Cys Leu Lys						
160	165	170				
TTC ATG ACC AAT GAG ACG CGG GAA CGG GAG GTA TTT GAC CGC CTA GGC						636
Phe Met Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp Arg Leu Gly						
175	180	185				
ATG ATC TAC ACC GTG GGA TAC TCC ATG TCT CTC GCC TCC CTC ACG GTG						684
Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Met Ser Leu Ala Ser Leu Thr Val						
190	195	200				

FIG. 3

GCT GTG CTC ATC CTG GCC TAT TTT AGG CGG CTG CAC TGC ACG CGC AAC Ala Val Leu Ile Leu Ala Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys Thr Arg Asn 205 210 215 220	732
TAC ATC CAC ATG CAC ATG TTC CTG TCG TTT ATG CTG CGC GCC GCG AGC Tyr Ile His Met His Met Phe Leu Ser Phe Met Leu Arg Ala Ala Ser 225 230 235	780
ATC TTC GTG AAG GAC GCT GTG CTC TAC TCT GGC TTC ACG CTG GAT GAG Ile Phe Val Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Asp Glu 240 245 250	828
GCC GAG CGC CTC ACA GAG GAA GAG TTG CAC ATC ATC GCG CAG GTG CCA Ala Glu Arg Leu Thr Glu Glu Leu His Ile Ile Ala Gln Val Pro 255 260 265	876
CCT CCG CCG GCC GCT GCC GTA GGC TAC GCT GGC TGC CGC GTG GCG Pro Pro Pro Ala Ala Ala Val Gly Tyr Ala Gly Cys Arg Val Ala 270 275 280	924
GTG ACC TTC TTC CTC TAC TTC CTG GCT ACC AAC TAC TAC TGG ATT CTG Val Thr Phe Leu Tyr Phe Leu Ala Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu 285 290 295 300	972
GTG GAG GGG CTG TAC TTG CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCC TTT TTC TCA Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser 305 310 315	1020
GAG AAG AAG TAC CTG TGG GGC TTC ACC ATC TTT GGC TGG GGT CTA CCG Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Ile Phe Gly Trp Gly Leu Pro 320 325 330	1068
GCT GTC TTC GTG GCT GTG TGG GTC GGT GTC AGA GCA ACC TTG GCC AAC Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Glu Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn 335 340 345	1116
ACT GGG TGC TGG GAT CTG AGC TCC AGG AAC AAG AAG TGG ATC ATC CAG Thr Gly Cys Trp Asp Leu Ser Ser Glu His Lys Lys Trp Ile Ile Gln 350 355 360 365	1164
GTG CCC ATC CTG GCA TCT GTG CTC AAC TTC ATC CTT TTT ATC AAC Val Pro Ile Leu Ala Ser Val Val Leu Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn 370 375 380	1212
ATC ATC CGG GTG CTT GCC ACT AAG CTT CGG GAG ACC AAT GCG GGC CGG Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg 385 390 395	1260
TGT GAC ACC AGG CAG CAG TAC CGG AAG CTG CTC AGG TCC ACG TTG GTG Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Arg Ser Thr Leu Val 400 405 410	1308

9/30

3 of 3

FIG. 3

CTC GTG CCG CTC TTT GGT GTC CAC TAC ACC GTC TTC ATG GCC TTG CCC Leu Val Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Thr Val Phe Met Ala Leu Pro 415 420 425	1356
TAC ACC GAG GTC TCA GGG ACA TTG TGG CAG ATC CAG ATG CAT TAT GAG Tyr Thr Glu Val Ser Gly Thr Leu Trp Gln Ile Gln Met His Tyr Glu 430 435 440 445	1404
ATG CTC TTC AAC TCC TTC CAG GGA TTT GTT GCC ATC ATA TAC TGT Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys 450 455 460	1452
TTC TGC AAT GGT GAG GTG CAG GCA GAG ATT AGG AAG TCA TGG AGC CGC Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Arg Lys Ser Trp Ser Arg 465 470 475	1507
TGG ACA CTG GCG TTG GAC TTC AAG CGC AAA GCA CGA AGT GGG AGT AGC Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser 480 485 490	1546
AGC TAC AGC TAT GGC CCA ATG GTG TCT CAC ACG AGT GTG ACC AAT GTG Ser Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val 495 500 505	1596
GGC CCC CGT GCA GGA CTC AGC CTC CCC CTC AGC CCC CGC CTG CCT CCT Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu Ser Pro Arg Leu Pro Pro 510 515 520 525	1644
GCC ACT ACC AAT GGC CAC TCC CAG CTG CCT GGC CAT GCC AAG CCA GGG Ala Thr Thr Asn Gly His Ser Gln Leu Pro Gly His Ala Lys Pro Gly 530 535 540	1692
GCT CCA GCC ACT GAG ACT GAA ACC STA CCA GTC ACT ATG GCG GTT CCC Ala Pro Ala Thr Glu Thr Glu Thr Leu Pro Val Thr Met Ala Val Pro 545 550 555	1740
AAG GAC GAT GGA TTC CTT AAC CGC TCC TGC TCA GGC CTG GAT GAG GAG Lys Asp Asp Gly Phe Leu Asn Gly Ser Cys Ser Gly Leu Asp Glu Glu 560 565 570	1783
GCC TCC GGG TCT GCG CGG CCG CCT CCA TTG TTG CAG GAA GGA TGG GAA Ala Ser Gly Ser Ala Arg Pro Pro Pro Leu Leu Gln Glu Gly Trp Glu 575 580 585	1836
ACA GTC ATG TGACTGGGCA CTAGGGGGCT AGACTGCTGG CCTGGGCACA 1885 Thr Val Met 590	
TGGACAGATG GACCAAGAAG CCAGTGTTG GCTGGTTGTC TATTGGGAT CTGGACCAGG 1945	
AAGATAACAA AAGGAAAATG GAAGTGGACG AAGCAGAGAA GAAGGAAGAG GTTTGCAGG 2005	
AATTAAATAT GTTCTCTAG TTGGATGATG AGGACACAAAG GAAGGC	2051

10/30

Fig. 4

Gap Weight: 3.000 Average Match: 0.540  
Length Weight: 0.100 Average Mismatches: -0.396

Quality: 712.2 Length: 595  
Ratio: 1.215 Gaps: 6  
Percent Similarity: 87.113 Percent Identity: 77.835

11/30

Fig. 5

R15	MGAARIAPSL	ALLLCVPVS	SAYALVDADD	VFTKEEQIPL	LHRAQAQCDK	50
Oko	MGAPRISHSL	ALLLCCSVLS	SVYALVDADD	VITKEEQIIL	LRNAQAQCEO	50
Okh	MGAPRISHSL	ALLLCCSVLS	SVYALVDADD	VITKEEQIIL	LRNAQAQCEO	50
----- A -----						
R15	LLKEVLHTAA	NIMESDKGWT	PASTSGKPRK	EKASGRKYPE	SKENKDVTG	100
Oko	RLKEVLR.VP	ELAESAKDW.	.MSRSAKTRK	EKPAAEKLYPQ	AEESEREVSDR	97
Okh	RLKEVLR.VP	ELAESAKDW.	.MSRSAKTRK	EKPAAEKLYPQ	AEESEREVSDR	97
*						
R15	SRRRGRCPLP	EWDNIVCWPL	GAPGEVVAVP	CPDYIYDFNH	KGHAYRRCDR	150
Oko	SRLQDGFCPLP	EWDNIVCWPA	GVPGKVVAVP	CPDYFYDFNH	KGRAYRRCDS	147
Okh	SRLQDGFCPLP	EWDNIVCWPA	GVPGKVVAVP	CPDYFYDFNH	KGRAYRRCDS	147
----- B -----						
N	N	N	N			
R15	NGSWEVVPGH	NRTWANYSEC	LKFMTNETRE	REVFDRLGMI	YTVGYSMSLA	200
Oko	NGSWELVPGN	NRTWANYSEC	VKFLTNETRE	REVFDRLGMI	YTVGYSISLG	197
Okh	NGSWELVPGN	NRTWANYSEC	VKFLTNETRE	REVFDRLGMI	YTVGYSISLG	197
-----						
R15	SLTVAVLILA	YFRLRHCTR	YIHMMLPLSF	MLRAASIFVK	DAVLYSGFTL	250
Oko	SLTVAVLILG	YFRLRHCTR	YIHMMLFVSF	MLRAVSIPIK	DAVLYSGVST	247
Okh	SLTVAVLILG	YFRLRHCTR	YIHMMLFVSF	MLRAVSIPIK	DAVLYSGVST	247
-- C ----- D -----						
R15	DEAERITEEE	LHIAQVPPP	PAAAAVGYAG	CRVAVTFPLY	FLATNYYWIL	300
Oko	DEIERITEEE	LRAFTE...P	PPADKAGFVG	CRVAVTVFLY	FLTTNYYWIL	294
Okh	DEIERITEEE	LRAFTE...P	PPADKAGFVG	CRVAVTVFLY	FLTTNYYWIL	294
----- E -----						
R15	VEGLYLHSLI	FMAFFSEKKY	LWGFTIPGWG	LPAVFWAVWV	GVRATLANTG	350
Oko	VEGLYLHSLI	FMAFFSEKKY	LWGFTLFGWG	LPAVFWAVWV	TVRATLANTE	344
Okh	VEGLYLHSLI	FMAFFSEKKY	LWGFTLFGWG	LPAVFWAVWV	TVRATLANTE	344
----- F ----- G -----						
R15	CWDLSSGHKK	WIIQVPILAS	VVLNPILFIN	IIRVLATKLR	ETNAGRCCTR	400
Oko	CWDLSSGNKK	WIIQVPILAA	IVVNPFILFIN	IIRVLATKLR	ETNAGRCCTR	394
Okh	CWDLSSGNKK	WIIQVPILAA	IVVNPFILFIN	IIRVLATKLR	ETNAGRCCTR	394
----- H -----						
R15	QQYRKLLRST	LVLVPLFGVH	YTIVFMALPYT	EVSGTLWQIQ	MHYEMLFNSF	450
Oko	QQYRKLLKST	LVLMPPLFGVH	YIVFMATPYT	EVSGILWQVQ	MHYEMLFNSF	444
Okh	QQYRKLLKST	LVLMPPLFGVH	YIVFMATPYT	EVSGILWQVQ	MHYEMLFNSF	444
----- I -----						
R15	QGFFVAIICYC	FCNGEVOAEI	RKSWSRWTLA	LDFKRKARSG	SSSYSYGPMV	500
Oko	QGFFVAIICYC	FCNGEVOAEI	KKSWSRWTLA	LDFKRKARSG	SSTSYSYGPMV	494
Okh	QGFFVAIICYC	FCNGEVOAEI	KKSWSRWTLA	LDFKRKARSG	SSTSYSYGPMV	494
-- J -----						
R15	SHTSVTNVGP	RAGLSLPLSP	RLPP...ATT	NGHSQLPGHEA	KPGAPATETE	547
Oko	SHTSVTNVGP	RGGLALSLSP	RLAPGAGASA	NGHSQLPGYV	KHGSISENSL	544
Okh	SHTSVTNVGP	RGG.....	....WPCPSA LD			515
*						
R15	TLPVTMAVPK	DDGFLNGSCS	GLDEEASGSA	RPPFLLQEGW	ETVM	591
Oko	PSSGPEPGTK	DDGYLN.G..S	GLYEPMVG.E	QPPPLLEER	ETVM	585

12 / 30

FIG. 5

With 2 enzymes: SAC

February 27, 1992 18:30

13/80

G S W E L V R G H N R T W A I : F B C V -	
aaattttccac. Atçaqactcctcaacggaggtttgaccgcctggcatçattac	542
ttttaaagagtggttactctgagcacttgcctccacaaactggcgaccgtactaaatg	601
K F L T N E T R E R E V F D R L G M I Y -	
accctgggtactccgtgtccctggcgccccctaccgttagctgtgcctcatectggctac	602
tggcacccgatçagggcacagggaccgcaggagtggttcacaccaqttaggaccggatg	661
T V G Y S V S L A S L T V A V L I L A Y -	
tttaggcggctgcactgcacgcgcaactacatccacatgcaccttttctgtccttcata	662
aatccgccgacgtgacgtgcccgttatgttaggtgtacgtggacaaggacaaggaaatgc	721
F R R L H C T R N Y I H M H L F L S F M -	
ctgcgcgcctgacatcttgcgtcaaggacacctgtgttactctggcgccacgcctgtat	722
gacgcgcggacteştagaaqcaqttctgacacacgagatgagaccşcggtgcaacta	781
L R A V S I F V K D A V L Y S G A T L D -	
gaggctgagccctcacccaggaggagctşccgcctatcggccaggeşccccccgcgcct	782
ctccgactcgcgagtggtccctccacccgcggtagcggtccşcgggggcgccggaa	841
E A E R L T E E L R A I A Q A ? P P P -	
gccaccgcctgcccgtacgcggctcagggtggcgtgaccttttttacttc	842
cggtggcgccgacccgatgcgcceşacccctccacccacactggaaagaaggaaatgaag	901
A T A A A G Y A G C R V A V T F F L Y F -	
ctggccaccaactactggattctggatşaggggetşacctçcacacgcctcatctc	902
şacccştçgtişatçacctaagaccacşccşacatçgacotştçgagtgaaş	961
Z A T N Y Y W Z L V E S I Y J H S L I F -	
atçggcttctcaqagaagaaqtaacctşggctcacagtctşşşctgggggtczag	962
şaccşgaqaaqagtccttctteatggacacccşaaotştcaqaaqccşacccşagac	1021
M A F F S E K K Y L W S F T V F G W G L -	
cccşctgtcttştggctgtgtgggtcaotştcaqagctaccctggccaacacccgggtgc	1022
şggcşacagaqacaccşacacacccşagtcacagtcşşşatggaccşşştggcccac	1081
P A V F V A V W V S V R A T L A N T G C -	

S 3 C 1



15/30

1632 *ccccctggccatggcgtccaaaggacgtgggttcctcaacggctttt* 1741  
*ggccgacccttacccgaccgggttttgttgcctcaaggacttgcccaaggacgtccggac*

卷一  
上  
第六章  
政治、文化与社会  
◎政治与社会

1742 ~~gacgaggagggcccttggccctgacgcggccaccttacccctgtacaggaatcgagaca~~  
~~ctcttcctccggagacccggactcgcggatggacggcacgatcttttttacccttgt~~ 1801

For example, the following table shows the results of a study comparing the effectiveness of two different treatments for depression:

1802 ~~gtcatgtgaccaqgcctggggctggacctgtcacatagtggatqgacagatggacca~~ 1861  
-----  
~~cactacactggtecqcqacccccccacctggaccacttatcacctaccttgttaccatgt~~

b v m

1362 aaagatcggtggttgaatgattccccactcaaggcctggggccaagacggaaaaacaggg  
----- 1921  
tttccaccaccaactactaaacgggtgagttccggacccggtgtcttttttgtcccc

3

b

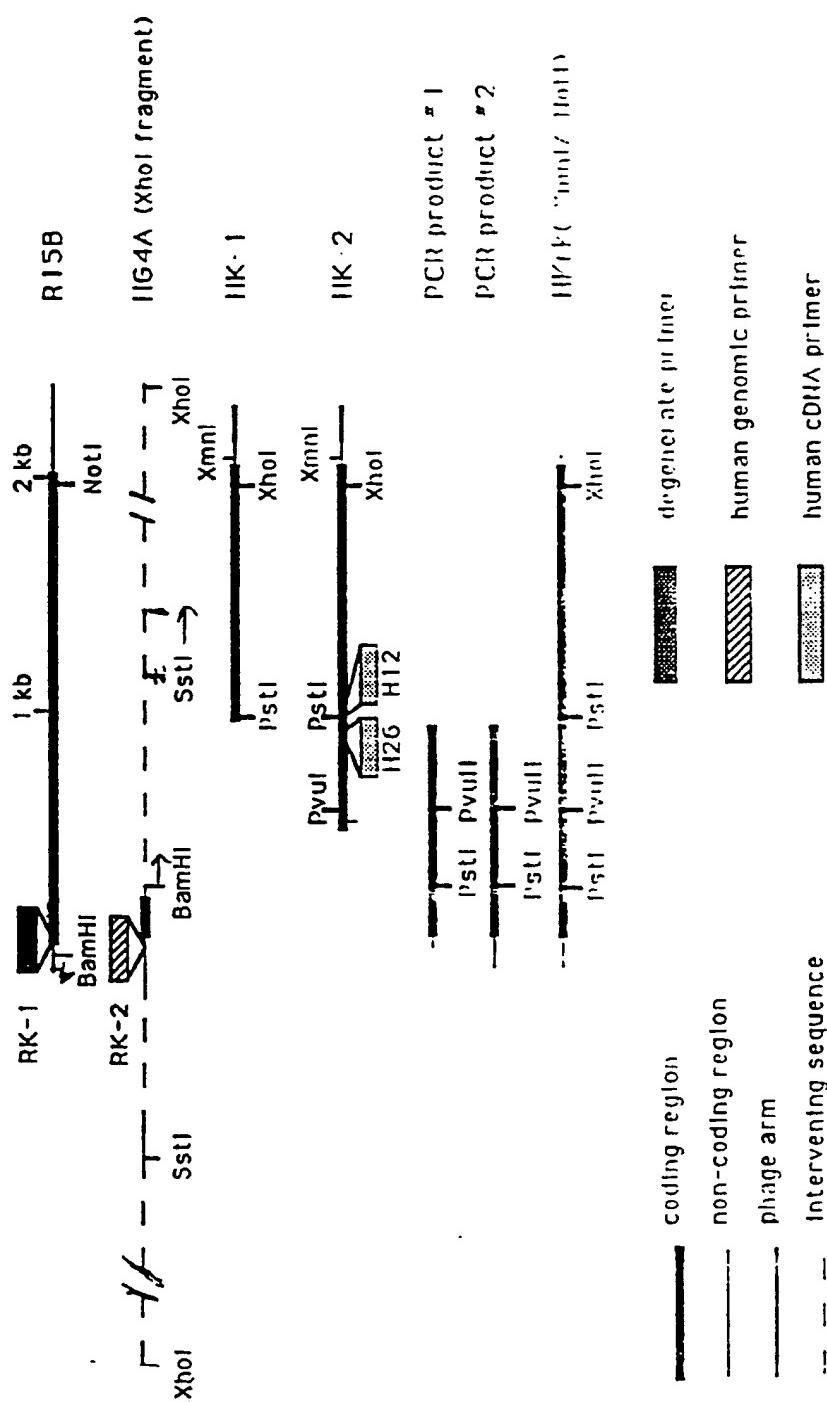
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa  
1982 ----- 2011  
tttttttttttttttttttttttttttttt

5

### Enzymes that do cut:

Saci

16/30



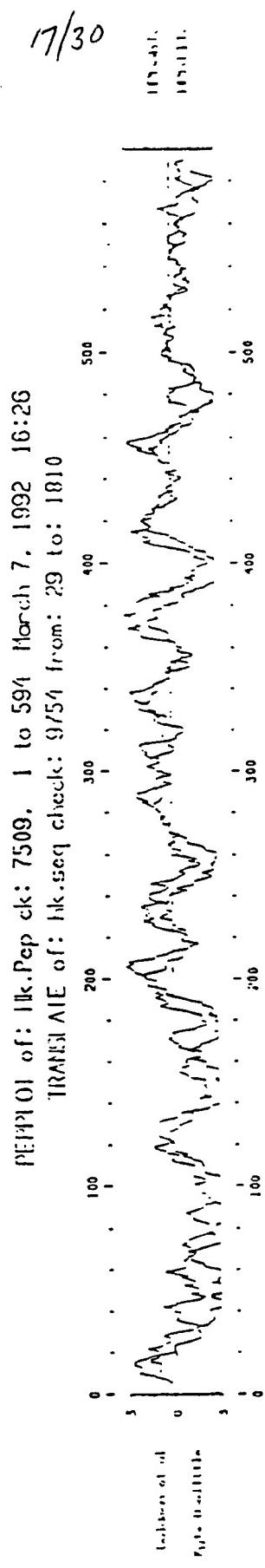
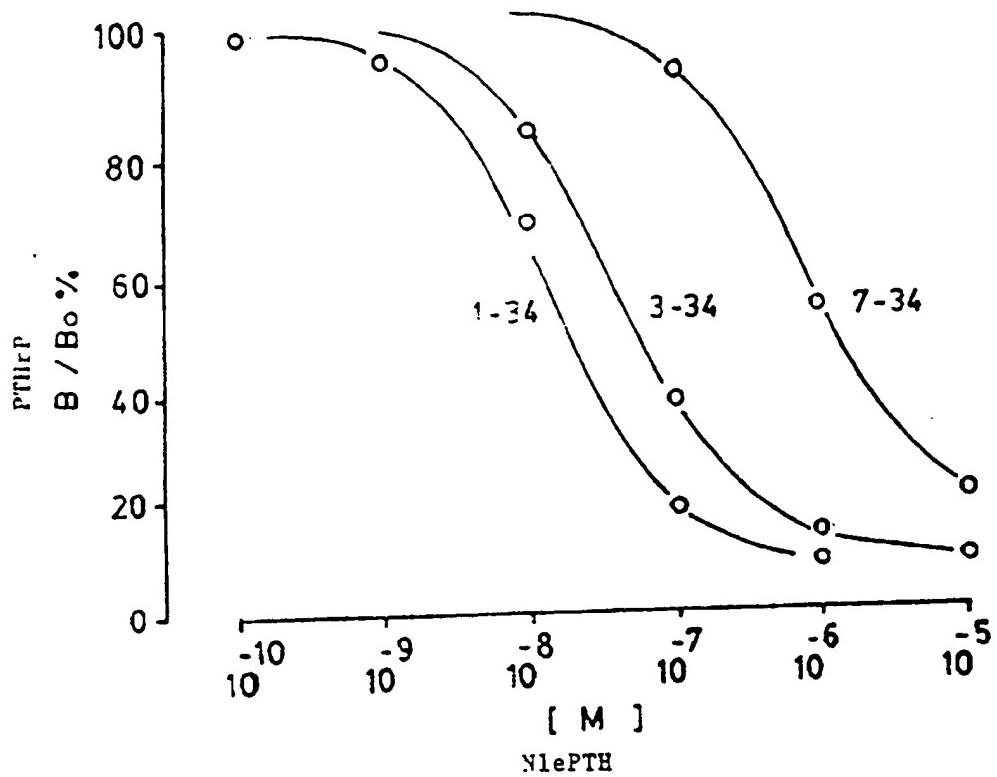


Fig.3

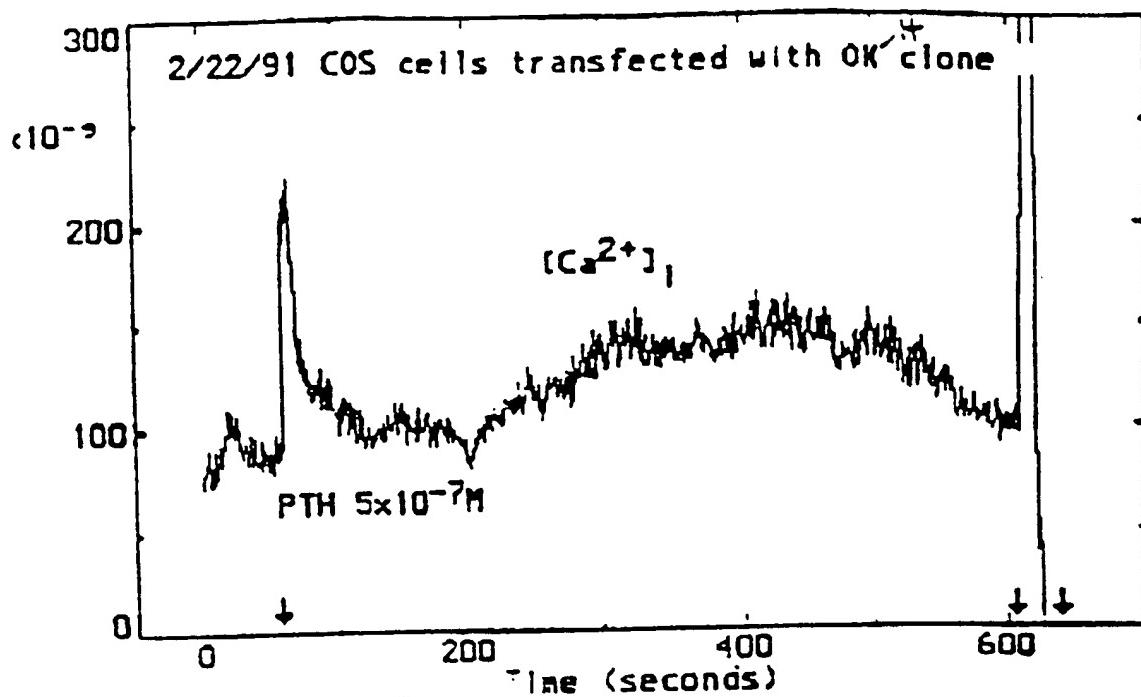
18/30

FIG. 9



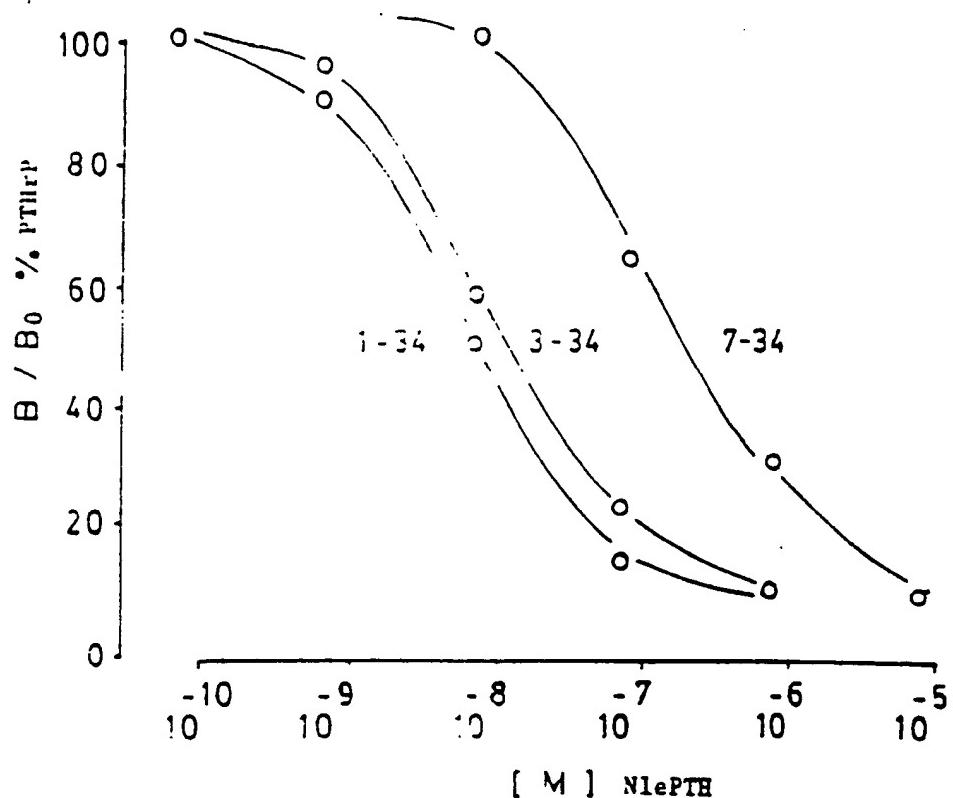
19/30

FIG. 10



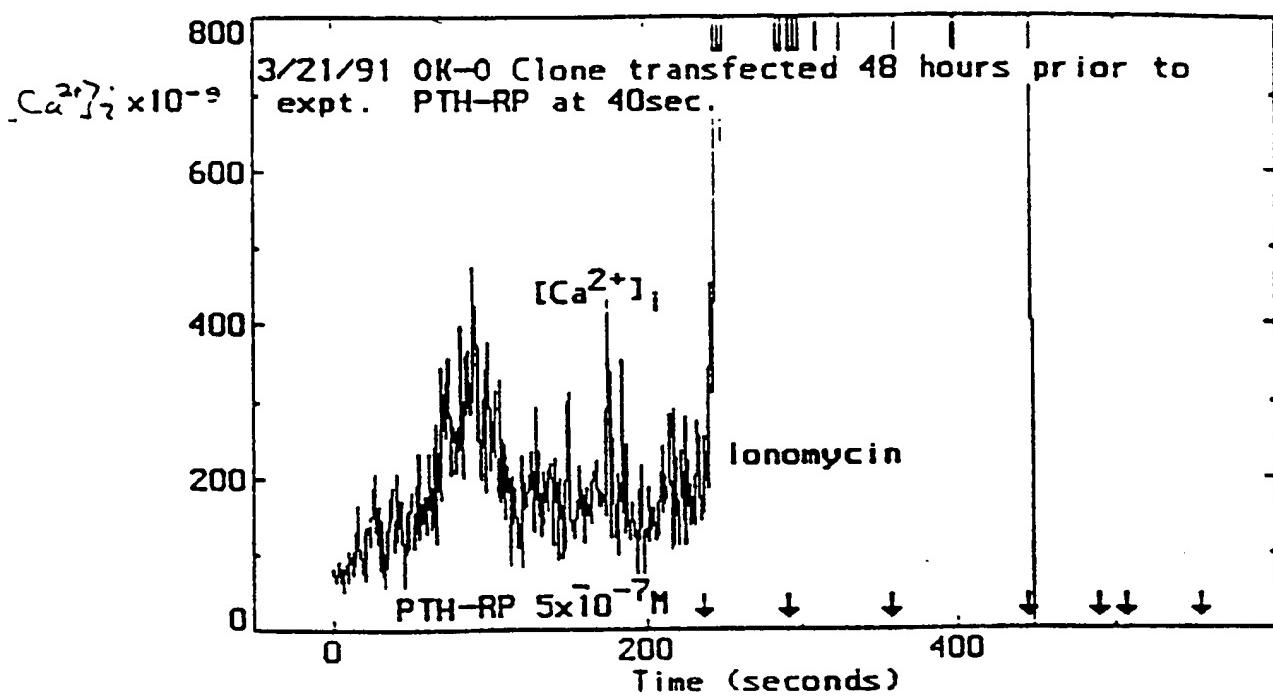
20/30

Fig. 11



21/30

FIG.12



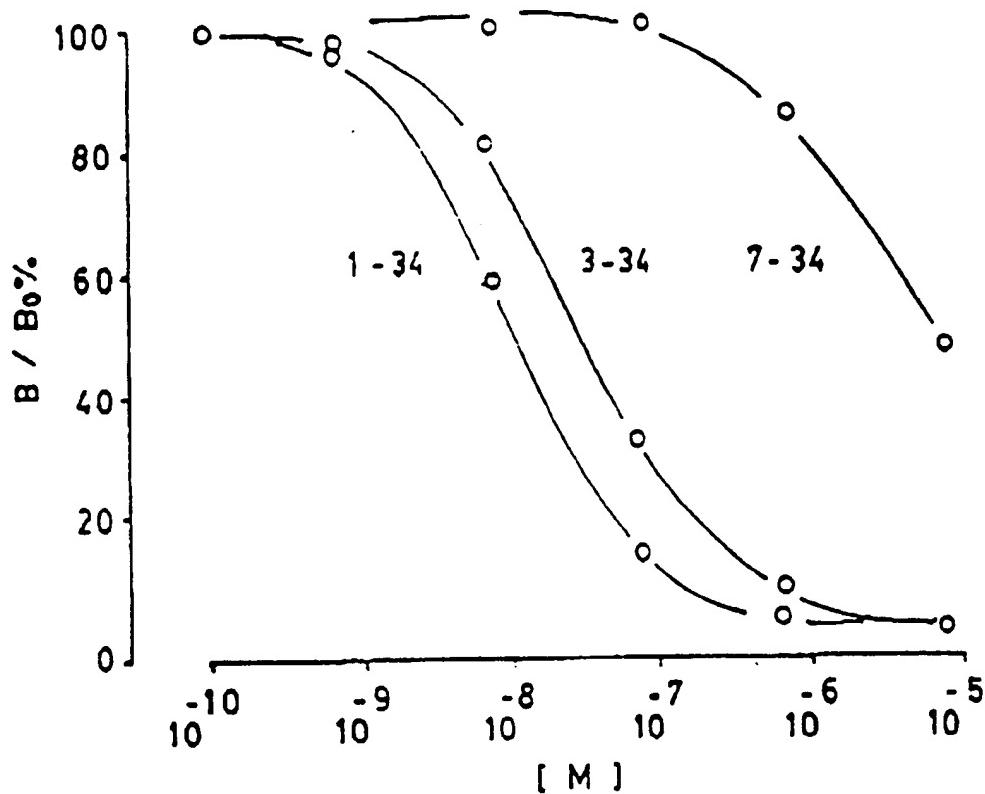
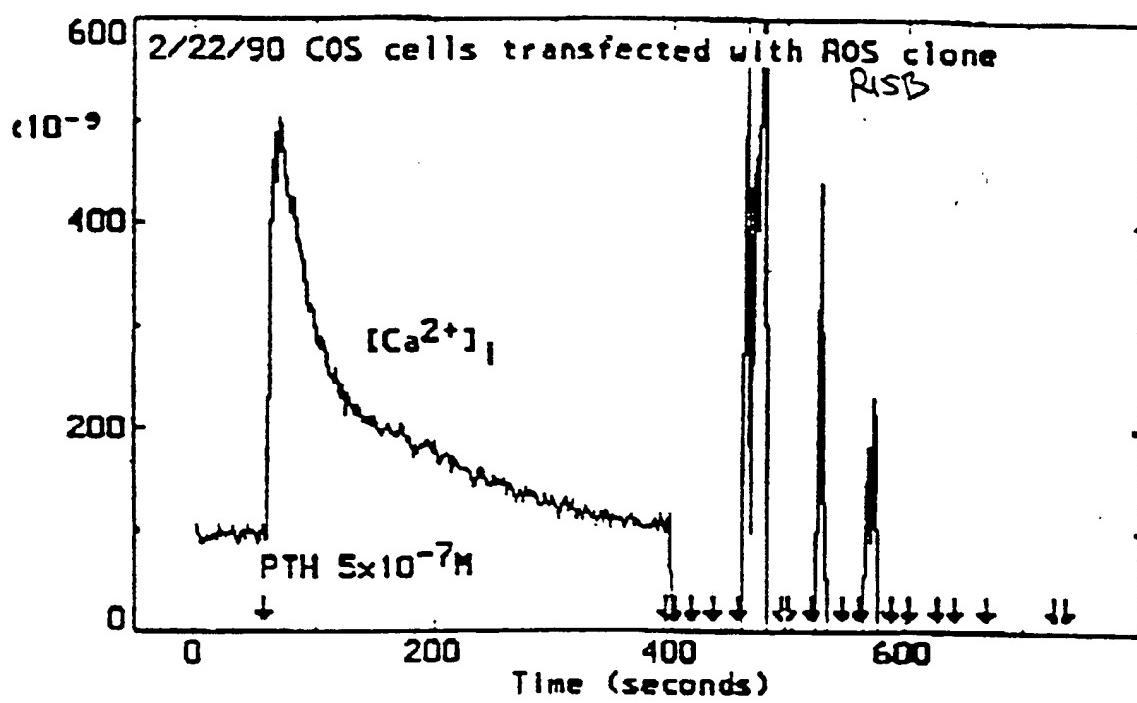


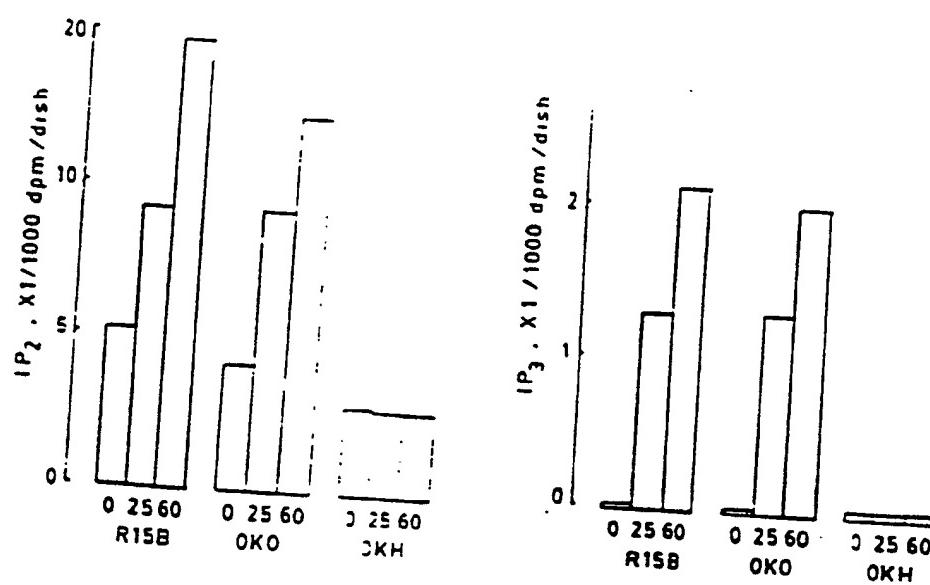
FIG. 13

FIG. 14



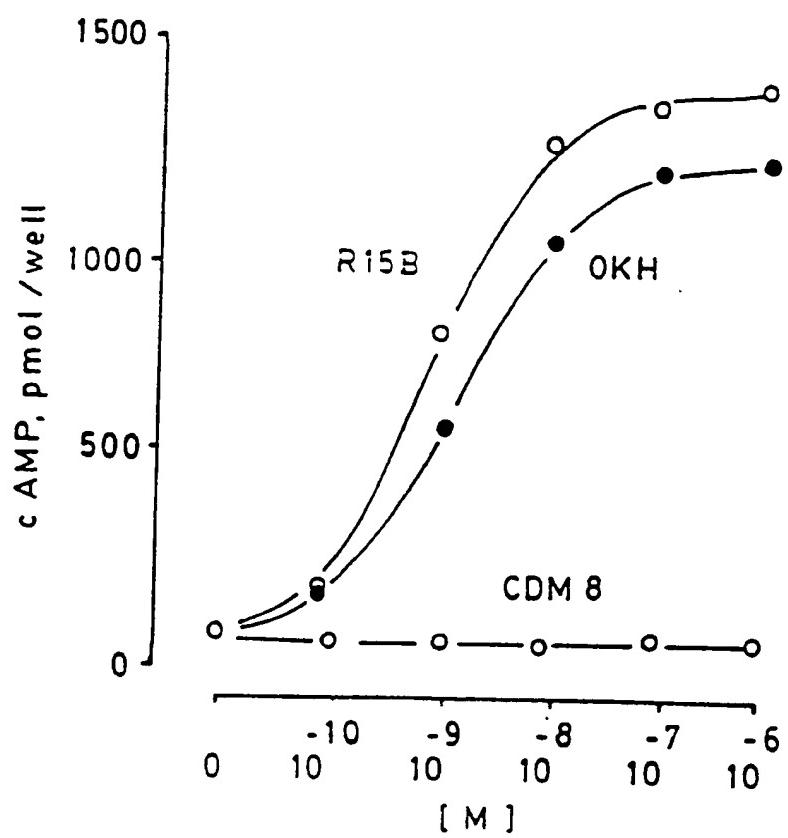
24/30

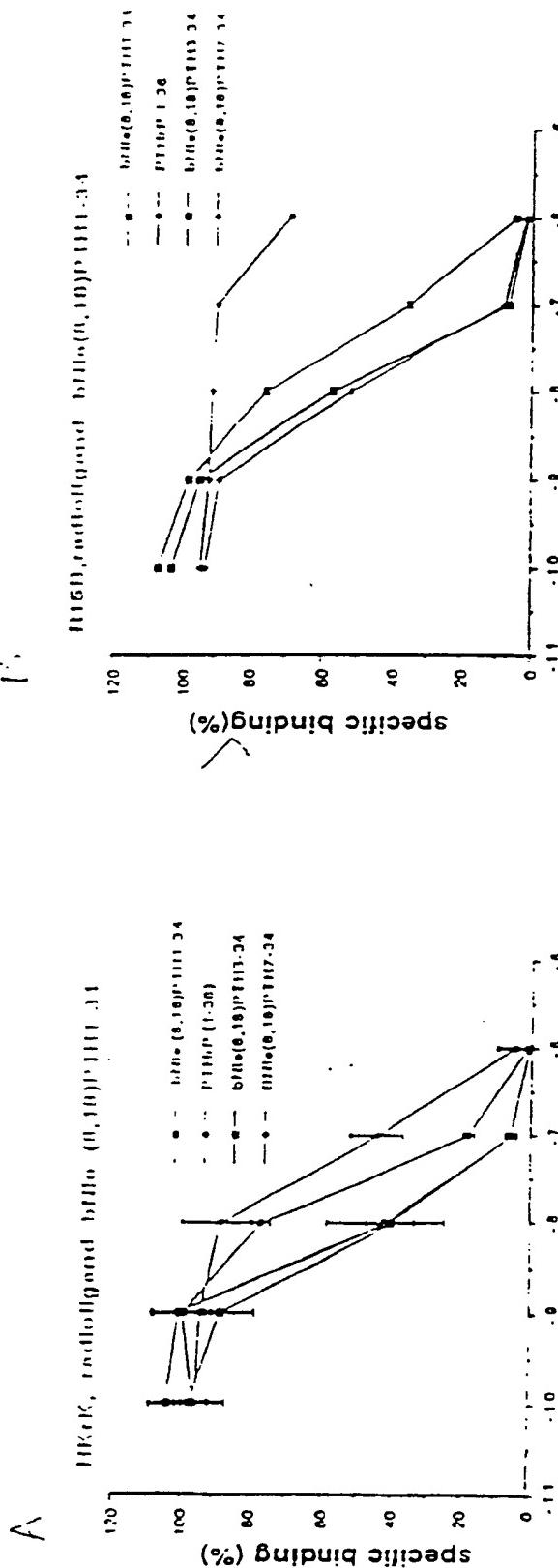
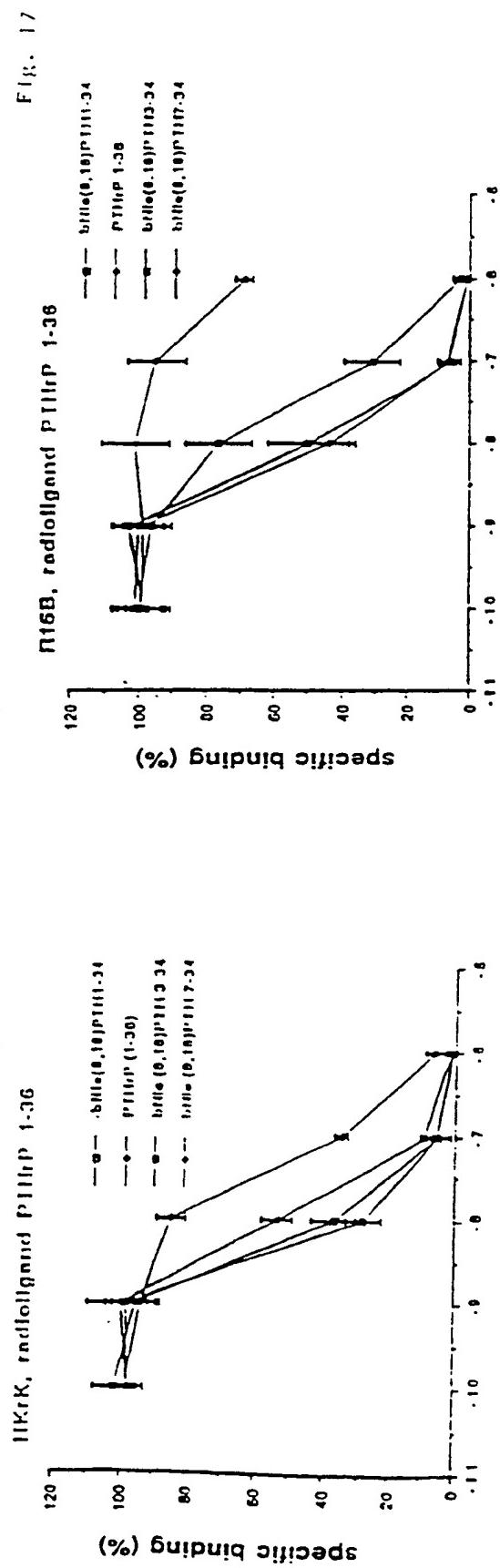
FIG. 15



25/30

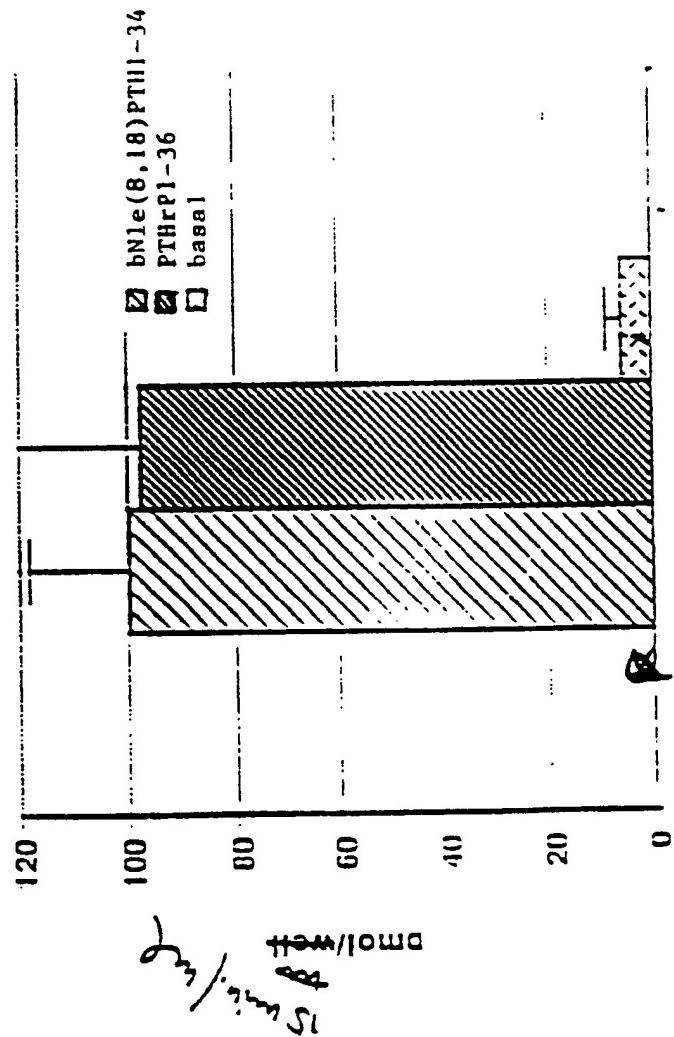
FIG. 16





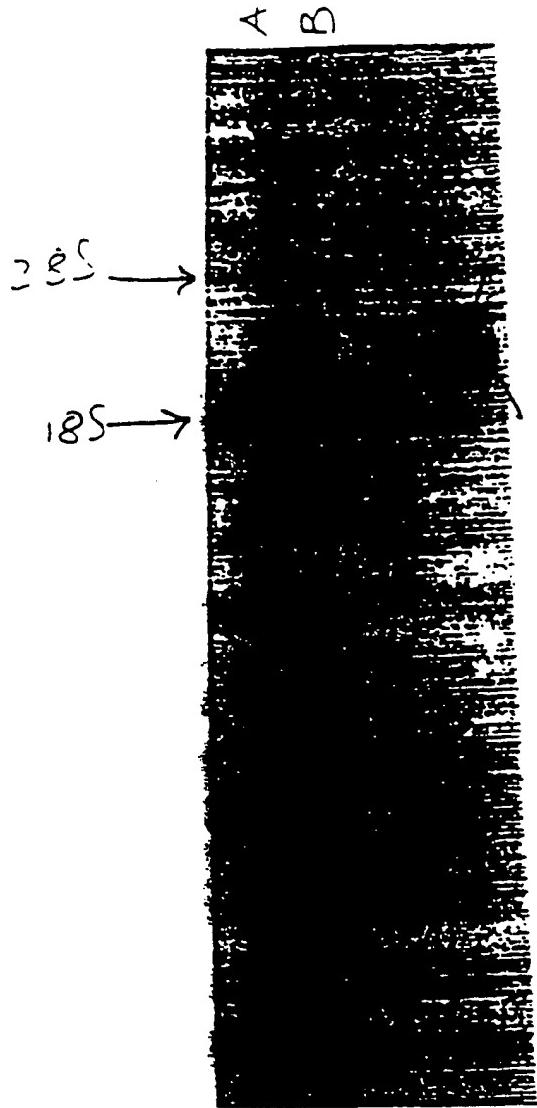
2130

FIG. 18



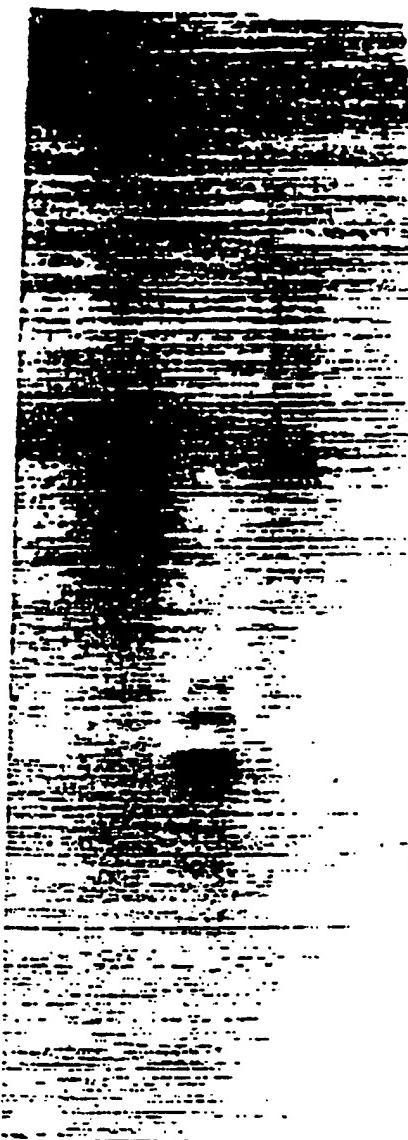
28/30

Fig. 19



29 / 30

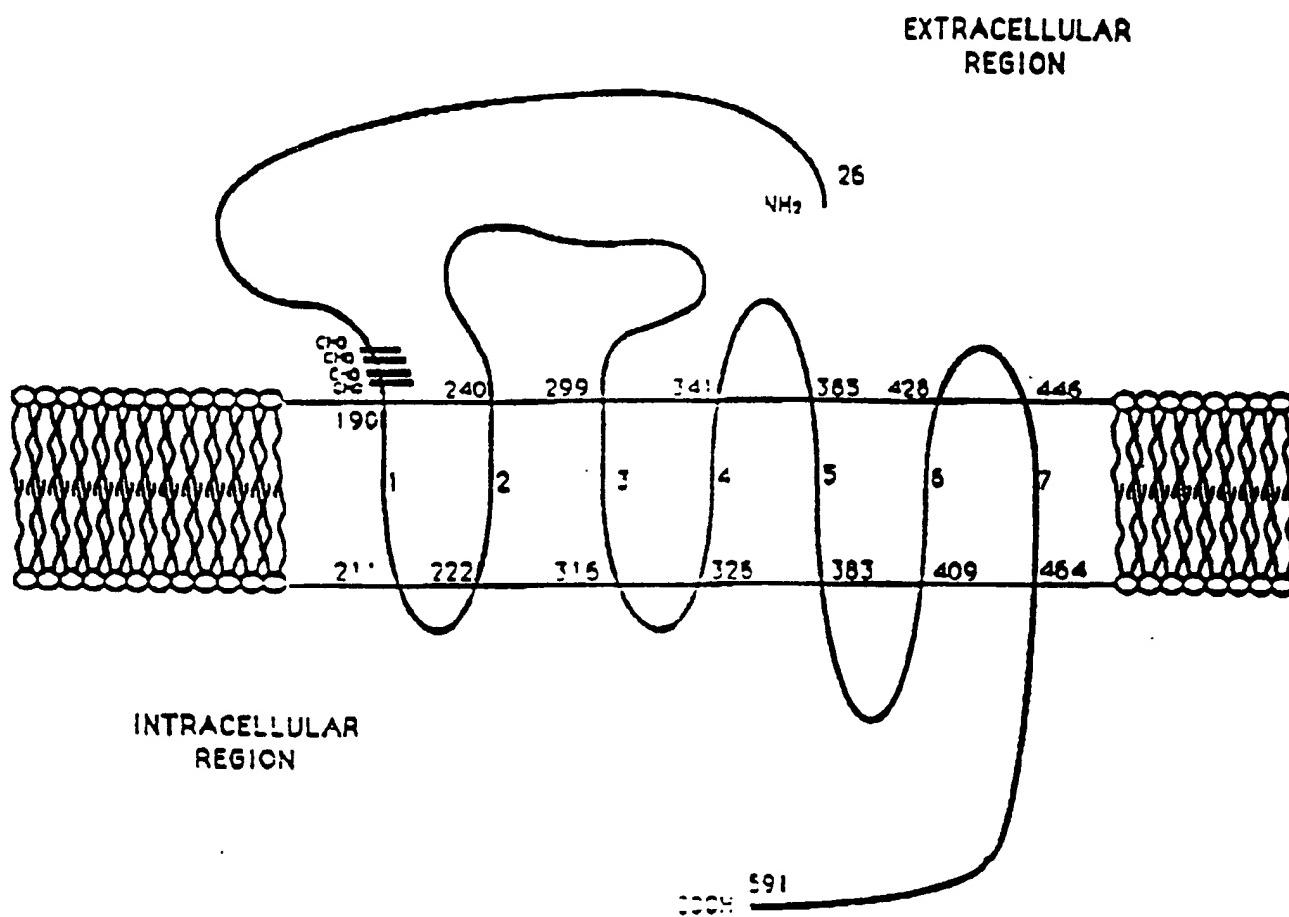
Fig. 20



30/30

Fig. 21

## RAT BONE PTH/PTHrP RECEPTOR



## AMINO ACID SEQUENCE OF 7 PUTATIVE TRANS-MEMBRANE REGIONS

1 VGYSMSLAS-TVAVLILAY	2 IHHHMFLSFMLRAASFVK	3 LVEGLYLHSLIFMAFFS
6 STLVLVPLFGVHVTVFALP	5 VP LASVVVNLIFENIR	4 IPGWGLPAVFVAVWVGV
7 MLFNSFOGFFVAVIYCFCN		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US92/02821

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(S) :Please See Extra Sheet.

US CL :435/69.1, 240.2, 320.1; 536/27, 28, 29; 530/350, 387, 397, 399.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : APS AND COMMERCIAL DATABASES (DIALOG) 435/69.1, 240.2, 320.1; 536/27, 28, 29

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG AND ONLINE SEQUENCE SEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	TWENTY-SEVENTH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY, VOLUME 105, NO. 4, PT. 2, ISSUED OCTOBER 1987, R. A. LUBEN ET AL., "MOLECULAR CLONING OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED MEMBRANE PROTEIN FROM MOUSE BONE CELLS", ENTIRE DOCUMENT.	1-19, 39 20-38, 40-49
Y	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL 265, NO. 1, ISSUED 05 JANUARY 1990, ABOU-SAMRA ET AL., "CHARACTERIZATION OF FULLY ACTIVE BIOTINYLATED PARATHYROID HORMONE ANALOGS", PAGES 58-62, ENTIRE DOCUMENT.	1-49 -
Y	BIOCHEMISTRY, VOLUME 29, NO. 30, ISSUED 31 JULY 1990, JUPPNER ET AL., "PREPARATION AND CHARACTERIZATION (N-(4-AZIDO-2-NITROPHENYL)ALA, TYR-36)-PATHYROID HORMONE RELATED PEPTIDE (1-36) AMIDE: A HIGH-AFFINITY, PARTIAL AGONIST HAVING HIGH CROSS-LINKING EFFICIENCY WITH ITS RECEPTOR ON ROS 17/2.8 CELLS", PAGES 6941-6946, ENTIRE DOCUMENT.	1-49

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*E* earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

01 JULY 1992

Date of mailing of the international search report

31 JUL 1992

Name and mailing address of the ISA/  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT

Washington, D.C. 20231

Facsimile No.

Authorized officer

GIAN WANG

Telephone No. (703) 308-3993

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US92/02821

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:**

IPC (S):

C12P 21/06; C12N 5/00, 15/00; C07H 15/12, 17/00; C07K 3/00; A61K 35/14, 37/24, 37/36.

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**